

ISTITUTO D'IGIENE

della R. Università di Siena
(Prof. A. SCLAVO)

ISTITUTO DI MEDICINA LEGALE

della R. Università di Genova
(Prof. A. SEVERI)

S

Dott. CARLO FERRAI

Assistente presso l'Istituto di Medicina legale della R. Università di Genova

138

**Influenza della putrefazione sulla sostanza
agglutinante per il tifobacillo in rapporto
alla Medicina legale.**

Agglutinante

RICERCHE SPERIMENTALI.

Estratto dal Bollettino della R. Accademia Medica di Genova
Anno XVII N. XV

GENOVA
R. Stab. Tipo-Litografico Fratelli Cabella
VIA CAFFARO NUM. 8

1903

ISTITUTO D'IGIENE

della R. Università di Siena
(Prof. A. SCLAVO)

ISTITUTO DI MEDICINA LEGALE

della R. Università di Genova
(Prof. A. SEVERI)

Dott. CARLO FERRAI

Assistente presso l'Istituto di Medicina legale della R. Università di Genova

Influenza della putrefazione sulla sostanza agglutinante per il tifobacillo in rapporto alla Medicina legale.

RICERCHE SPERIMENTALI.

Estratto dal Bollettino della R. Accademia Medica di Genova
Anno XVII N. XV

GENOVA
R. Stab. Tipo-Litografico Fratelli Cabella
VIA CAFFARO NUM. 8

—
1903

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI SIENA
DIRETTO DAL PROF. A. SCLAVO

ISTITUTO DI MEDICINA LEGALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI GENOVA
DIRETTO DAL PROF. A. SEVERI

Influenza della putrefazione sulla sostanza agglutinante per il tifobacillo in rapporto alla Medicina Legale

Ricerche sperimentali del Dott. CARLO FERRAI

Assistente presso l'Istituto di Medicina Legale della R. Università di Genova

Fino dai primi tempi in cui si conobbe il fenomeno della agglutinazione del bacillo tifico, e si apprezzò il valore diagnostico e pratico della prova, ormai universalmente chiamata del **Widal**, alcuni autori accennarono alla importanza della prova stessa in medicina legale. A ciò furono tratti, più che altro, dalla constatazione che il sangue e il siero essiccato, conservano bene le loro proprietà agglutinanti, fatto che aveva permesso l'applicazione del metodo secco, particolarmente utile nei riguardi dell'igiene pubblica. Il **Widal** e **Sicard** (1) comunicarono anzi una nota nella quale indicavano come in alcune contingenze l'esame di una macchia di sangue riguardo al potere agglutinante pel bacillo tifico, potesse portare degli utili indizii sulla provenienza di un sangue, e permettere, con una certa approssimazione, di risalire all'individuo al quale il sangue stesso apparteneva mediante la determinazione del potere.

Mentre questa ultima affermazione degli autori francesi è,

a mio vedere, assai azzardosa, poichè come è noto, e come le indagini sia sull'uomo che sugli animali dimostrano, il potere del sangue di un individuo vivente può variare e varia di giorno in giorno, certo si è che non è impossibile, anzi potrà non esser raro che la reazione del **Widal** sulle macchie di sangue, si renda opportuna e giovevole in una indagine medico-legale.

Ma reputo che anche da un altro punto di vista, la prova del **Widal** meriti di attirare l'attenzione e le indagini del medico-legale, per accertare se essa sia atta e fino a qual punto, ad aiutare il perito nella risoluzione di difficili problemi. Le proprietà agglutinanti persistono a lungo nel cadavere e nelle parti di cadavere in putrefazione? Qual fondamento scientifico avrebbe un tentativo di determinazione del potere agglutinante degli organi di un cadavere? Ben s'intende come non rari possano e debbano essere i casi in cui una tale ricerca, se possibile, potrebbe essere di grande utilità: come per esempio quando si trattasse di rafforzare gli elementi di una identificazione che per altre vie riuscisse impossibile od incerta, oppure quando si volesse dimostrare l'esattezza e la verità di una diagnosi di tifo addominale che fosse stata per qualche motivo messa in dubbio dopo la sepoltura del cadavere.

Non ho bisogno d'insistere sulla opportunità di praticare indagini allo scopo di risolvere la sopraindicata questione, tosto che essa mi si fu presentata alla mente, poichè è indubbio che il medico-legale quando si tratti di questioni la cui risoluzione non può essere di breve momento ed affidata a qualche reazione o a qualche rapido esperimento ha il compito ed il dovere di intraprendere ricerche allo scopo di dilucidarle, anche se nell'istante un determinato caso pratico non lo richiede, aumentando così quel patrimonio di fatti provati ed accertati, di cui la scienza nostra ha così spesso bisogno. Ed in questo caso tanto più volentieri mi accingevo alle mie indagini, inquantochè con esse mentre tendevo alla risoluzione di un problema medico-legale, avevo nello stesso tempo modo di contribuire alla conoscenza della natura e comportamento di quelle sostanze agglutinanti che ancor oggi, insieme con tutto il rimanente dei fenomeni dell'immunità e della difesa dell'organismo costituiscono uno dei soggetti di studio più appassionanti e dibattuti.

*
* *

Praticai le seguenti indagini:

1° — Variazioni del potere agglutinante di sieri di potere diverso in preda alla putrefazione.

2° — Variazioni del potere agglutinante degli organi sottoposti alla putrefazione, separati dall'organismo.

3° — Variazioni del potere agglutinante degli organi del cadavere inumato.

Nel corso di queste ricerche mi accadde di praticare qualche altra investigazione e di determinare qualche altro fatto di secondaria importanza, cui accennerò nel corso dell'esposizione delle esperienze.

Animali d'esperimento. — Nel corso dell'inverno 1900-901 avevo cominciato queste ricerche servendomi come animali da esperimento delle cavie, che trattavo secondo il metodo indicato dal **Sanarelli** (2) ed usato anche dal **Remlinger** (3) iniettando dapprima delle culture tifiche vecchie di qualche giorno e sterilizzate dipoi a 100° (il **S.** le sterilizzava a 120°), eppoi delle culture virulente. Circostanze indipendenti dalla mia volontà mi costrinsero allora a sospendere le mie ricerche. Riprendendole adesso, ritenni più opportuno operare sui conigli, più adatti, sia perchè sono in grado di fornire maggior quantità di sangue senza che sia necessario depauperarli troppo col salasso, sia perchè possiedono organi più voluminosi e più acconci quindi alle mie indagini.

Preparazione degli animali. — Il potere agglutinante veniva prodotto nei conigli mediante ripetute iniezioni di culture di bacillo di Eberth. Ritenni inutile il far uso di culture sterilizzate, come praticarono il **Fodor** e **Rigler** (4), il **Rath** (5), il **Bail** (6), il **Grünbaum** (7) ed altri, perchè vidi che anche le culture viventi, che del resto erano state usate da altri sperimentatori, servivano ottimamente allo scopo. Nè d'altra parte ritenni necessario d'esaltare la virulenza del bacillo tifico della colonia che mi servì per questi esperimenti, perchè per la produzione del potere agglutinante, come videro il **Pfeiffer** e **Marx** (8), non è necessario un microrganismo molto virulento. Il bacillo tifico di cui feci uso è quello della

collezione del Laboratorio d'Igiene della Università di Siena, della cui virulenza può aversi un accenno dalla prova seguente: 2 cc. cultura in brodo, di 72 ore, iniettati in peritoneo, produssero la morte di un coniglio di gr. 1270 in tre giorni circa.

Le iniezioni venivano fatte in cavità peritoneale: facevo uso delle culture in brodo dell'età di 48 h. circa: in alcuni conigli vennero fatte cinque iniezioni di 1 cc. ciascuna un giorno sì ed uno no: ad altri furono praticate tre sole iniezioni, a dosi ascendenti di $\frac{1}{2}$, $\frac{2}{3}$, 1 cc. ogni volta, ogni 72 ore.

Il potere agglutinante che si può ottenere con tale trattamento varia da animale ad animale, ma nei limiti di tali variazioni individuali il potere del siero di sangue va costantemente in tutti gli animali aumentando per un certo numero di giorni, man mano che ci si allontana dalle iniezioni. Su tale decorso del potere negli animali da esperimento vi sono parecchi dati nella letteratura. Così per indicarne alcuni più importanti, il **Grünbaum** (iniez. periton. culture steriliz. nelle cavie) afferma che la reazione si poteva avere solo dopo 3-4 giorni dall'iniezione. **Fodor** e **Rigler** (iniez. sotto cute cult. steril. nel coniglio) videro la reazione prodursi dopo 24 h. appena accennata, aumentare dopo 48 h. e farsi completa dopo 72 ore.

Il **Deutsch** (9) (iniez. intraperit. cult. steriliz. nella cavia) riconobbe che il potere del siero a partire dal 3°-4° giorno andava aumentando fino al 10°-12°, in cui raggiungeva il massimo, per ridiscendere in seguito. E l'**Iatta** (10) pure, che sperimentò sui conigli, vide il potere agglutinante comparire nel siero 3-4 giorni dopo l'iniezione, ma talvolta anche dopo 2 giorni.

Indico qui sotto, brevemente, i dati che risultarono in proposito nel corso delle mie esperienze:

CONIGLIO 1 — grigio — Kg. 1.500 — Gabbia 9.

Prova del Widal col siero Sangue avanti il trattamento: 1/5 negativo.

5 iniezioni di 1 c. c. Cult. brodo 48 h. in peritoneo un giorno sì ed uno no.

Ultima iniezione 26 agosto. Salasso 29 agosto. — Dall'ultima iniezione giorni 3 $\frac{1}{2}$.

Potere del siero esaminato il 30 agosto: 1/200.

CONIGLIO 2 — bianco — Kg. 1.250 — Gabbia 9.

Esaminato e trattato come il N.º 1. — Ultima iniezione 26 agosto — Salasso 29 agosto cioè dopo 3 1/2 giorni.

Potere del siero (esame 30 VIII): 1/400.

CONIGLIO 3 — grigio testa rasata — Kg. 1.080 — Gabbia 10.

Esaminato e trattato come i precedenti — Ultima iniezione 26 VIII — Salasso 30 VIII mattina cioè dopo 4 giorni.

Potere del siero (esame 30 VIII sera): 1/300.

CONIGLIO 4 — grigio dorso rasato — Kg. 1.300 — Gabbia 10.

Esaminato e trattato come sopra — Ultima iniezione 26 VIII — Salasso 30 VIII mattina cioè dopo 4 giorni.

Potere del siero (esame 30 VIII sera): 1/340.

CONIGLIO 1 — sopraindicato.

2.º salasso 1.º settembre cioè dopo giorni 6 1/2 dall'ultima iniezione.

Potere del siero (esame 2 IX): 1/850.

CONIGLIO 2 — sopra indicato.

2.º salasso 1. IX. Dall'ultima iniezione giorni 6 1/2.

Potere del siero (esame 2 IX): 1/1800.

CONIGLIO 3 — sopra indicato.

2.º salasso 1. IX. Dall'ultima iniezione giorni 6 1/2.

Potere del siero (esame 2 IX): 1/700.

CONIGLIO 4 — sopra indicato.

2.º salasso 1. IX. Dall'ultima iniezione giorni 6 1/2.

Potere del siero (esame 2 IX): 1/2400.

CONIGLIO 10 — grigio — Kg. 1.400.

Saggio preliminare del siero sangue: 1/5 negativo.

3 iniezioni di 1/2, 2/3. 1 cc cultura in brodo di 48 h. in peritoneo ad intervallo di 72 ore circa.

Ultima iniezione 30 settembre — Salasso 8 ottobre cioè dopo 8 1/2 giorni.

Potere del siero (esame 9 X): 1/5400.

CONIGLIO 13 — grigio — Kg. 1.150.

Esaminato e trattato come il precedente — Ultima iniezione 30 IX — Salasso 8 X cioè dopo 8 1/2 giorni.

Potere del siero (esame 9 X): 1/5300.

CONIGLIO 14 — grigio — Kg. 1.060.

Esaminato e trattato come il precedente — Ultima iniezione 30 IX — Salasso 8 X, dopo 8 1/2 giorni.

Potere del siero (esame 9 X): 1/6000.

CONIGLIO 15 — bianco — Kg. 1.200.

Esaminato e trattato come il precedente — Ultima iniezione 30 IX — Salasso 8 X, dopo 8 1/2 giorni.

Potere del siero (esame 9 X): 1/5600.

Dunque, negli animali da me trattati il potere agglutinante del siero di sangue: dopo 3 1/2 - 4 giorni dall'ultima iniezione, oscillò da 1/2 a 1/400; dopo 6 1/2 giorni, da 1/700 a 1/2400; dopo 8 1/2 giorni, da 1/5300 a 1/6000.

Metodica della determinazione del potere agglutinante.

— Come materiale da agglutinarsi mi servii delle culture viventi di bacillo tifico, che usate in modo opportuno rappresentano un materiale più sensibile ed adatto che non le culture uccise, preconizzate da qualche autore. Le culture (giovani) in brodo sono a mio parere le migliori: le emulsioni in brodo di culture su agar, giovani, possono dare un materiale abbastanza buono, ma la preparazione dell'emulsione richiede un certo tempo e molta cura, e spesso è necessario filtrare su carta. Nelle culture in brodo di 16-18 ore come le usavo io non è frequente trovare numerosi ammassi: ma ad ogni modo io usavo di un artificio che diminuiva la densità dei microrganismi e toglieva la tendenza alla formazione di piccoli ammassi spontanei, dandomi così un materiale ottimo, sia per la mobilità dei germi, sia per la loro completa separazione l'uno dall'altro. Diluivo cioè le culture in brodo con altro brodo, subito innanzi di servirmene, agitando brevemente il tubo per facilitare la uguale distribuzione dei germi. Avevo l'avvertenza di portare il brodo infetto nel tubo col brodo sterile, curando che le quantità dei due brodi fossero presso a poco uguali, inquantochè una troppo differente densità dei microrganismi può portare delle differenze non trascurabili nei risultati delle determinazioni, come ha veduto il **Winterberg** (11).

Del resto, lo dico qui una volta per sempre, ogni volta che mi accingevo a fare una serie di determinazioni, esaminavo dapprima la cultura originale e poi la diluizione di essa, in goccia pendente, per avere la certezza che il materiale fosse adatto, sia per la mobilità che per la separazione perfetta dei germi.

Il materiale di cui volevo praticare la determinazione del potere agglutinante (siero, estratto) e della cui preparazione parlerò in seguito, veniva, quando era opportuno, diluito con acqua fisiologica sterilizzata, e allorchè si aveva un potere molto elevato, la diluizione veniva a sua volta ancora diluita. Preferivo insomma che il liquido che mettevo a contatto colla cultura tifica non fosse eccessivamente potente, avendo potuto notare che le determinazioni riescono più esatte e costanti, quando si ha cura di diluire prima il siero da saggiare, che non quando si mette a contatto il siero poco diluito con grande quantità di cultura tifica. Il liquido da esaminare veniva

unito alla cultura tifica in vetrini da orologio: le proporzioni erano calcolate in gocce, avendo cura di far uso di pipette gemelle, per cui le differenze di volume delle gocce fossero trascurabili. Subito dopo deposta la goccia o le gocce di liquido da saggiare sulla cultura tifica (nella quantità necessaria per ottenere una determinata diluizione totale), il tutto veniva agitato con un ago di platino ripiegato all'estremo. L'esame veniva praticato dopo circa 30 minuti, mediante preparato in goccia pendente. Per ammettere un risultato positivo, non richiedeva che si avesse una agglutinazione di tutti quanti gli elementi bacillari, ma mi bastava che si formassero ancora dei gruppetti di 10-20 elementi, anche non troppo intimamente addossati l'un l'altro, mentre i rimanenti microrganismi erano isolati e più o meno torpidi nei loro movimenti. Questo fu il punto limite adottato anche dal **Deutsch** (9) e da altri sperimentatori ed è certo il più indicato ed opportuno, quando, ben s'intende, si disponga di emulsioni tifiche ad elementi perfettamente isolati. — Avevo anche cura di lasciare alcune gocce di cultura tifica senza alcuna aggiunta, ed altre con aggiunta di un po' di acqua fisiologica, per lo stesso tempo e nelle stesse condizioni delle altre prove, allo scopo di verificare, come sempre accadeva, la mancanza di formazione di pseudo ammassi spontanei.

La prima serie di ricerche, come ho indicato, fu rivolta a studiare l'influsso della putrefazione sul siero di sangue dotato di potere agglutinante pel bacillo di Eberth.

Sulla resistenza del potere agglutinante del siero di sangue e del sangue sia essiccato, sia conservato, sterile, sia inquinato, vi sono numerosi dati frammentari nella letteratura, dei quali indico brevemente i più importanti.

Per ciò che si riferisce al sangue essiccato i primi a richiamare l'attenzione sulla resistenza del potere agglutinante in esso furono il **Widal** e **Sicard** (1) che l'osservarono in siero e sangue essiccato su diverse sostanze, e che preconizzarono l'uso del metodo secco, che ebbe larghe applicazioni in igiene pubblica, particolarmente per parte di scienziati americani come l'**Iohnston** (12), il **Mc. Taggart** (13), il **Guerard** (14) ed anche in Germania, Francia, Italia (**Pfuhl** (15), **Vivaldi** (16), ecc.) L'**Achard** e **Bensaude** (17) verificarono che del siero agglutinante pel vibrione colerigeno, conservava potere aggluti-

nante anche dopo 5 mesi di essiccamento. Riguardo poi al siero e sangue conservati allo stato liquido il **Widal** e **Sicard** (18) (19) notarono la permanenza del potere anche dopo diversi mesi. Così del siero d'asino immunizzato, ad alto potere, dopo 15 mesi di conservazione presentava un valore agglutinante di 1/14000. Secondo l'**Iemma** (20) il siero conservato a temperatura ordinaria di 12°-15° conserverebbe il suo potere solo per 40 giorni, reperto che mal si spiega, come fa notare il **Fraenkel** (21). Il **Babucke** (22) constatò che mescolanze di acqua con sangue tifico dopo 6 giorni non presentavano alcuna diminuzione di potere. Se poi metteva in tubo di vetro, riempiendo quant'era possibile e chiudendo alla fiamma non aveva modificazione di potere neanche dopo 20 giorni. Il **Fodor** e **Rigler** (4) affermano che del sangue conservato in vitro in ghiacciaia si mantenne per un mese attivissimo, mentre dopo 6 settimane il suo potere discese fortemente. Il **Van Emden** (23) dice che un siero che aveva verso il bacillo aerogene un potere agglutinante del 1/15000, per quanto tenuto in ghiacciaia dopo 5 settimane presentava un potere del 1/100; e che la stessa diminuzione verificò pel bacillo di Eberth, ond'è che ritiene erronee le affermazioni del **Widal** e **Sicard**. Pel **Winterberg** (11) invece che ha studiato l'azione di varii agenti sulla sostanza agglutinante, nel siero di sangue, la putrefazione, come pure lo sviluppo di microrganismi patogeni, non avrebbe alcun influsso sul potere agglutinante. Infatti seminati dei tubi di siero (potere 1/1800) con « microrganismi della putrefazione » e con altri microrganismi, (tifo, colera, carbonchio, b. coli, difterite, piocianico ecc.), e messi in termostato dopo averli chiusi alla lampada, non avrebbe trovata alcuna diminuzione di potere dopo 14 giorni, per quanto in tutti i tubi lo sviluppo dei germi fosse abbondante! E per contro il **Puppel** (24) che determinò il potere agglutinante nel siero di sangue di malati tifici, conservato, sostiene di aver notato costantemente una diminuzione più o meno rapida secondo i casi. Il **Fraenkel** (25) più recentemente ancora, nota a questo proposito, di possedere dei sieri che anche dopo tre mesi erano attivi all' 1/50.

Del resto che in condizioni relativamente favorevoli, cioè senza che intervenga un vero e progredito processo putrefattivo, il siero possa conservare molto a lungo il potere agglu-

tinante basta a dimostrarlo il fatto che nel Laboratorio d'Igiene dell'Università di Siena il prof. **Sclavo** conserva un siero di cavallo datante dall'anno 1897, e che è ancora abbastanza attivo, nonostante lo sviluppo di muffa, da servire annualmente alla dimostrazione della prova del **Widal**!

Un altro fatto che sembra assodato si è che, contrariamente alle affermazioni del **Courmont** (26) e di altri, lo sviluppo del bacillo tifico in un siero dotato di potere agglutinante, non è capace di togliere questo potere, poichè oltre la succitata esperienza del **Winterberg** (11) il **Widal** e **Sicard** (19) riferiscono che del pus di animale trattato col tifo, conservato per ben 15 mesi, lasciava sopranotare un siero ch'era dotato ancora di un potere del 1/13000, per quanto vi fosse presenza di numerosi bacilli di Eberth.

Ed ecco adesso i risultati delle mie esperienze:

I. — ESPERIENZE SUI SIERI PUTREFATTI

A) Prima serie di sieri posti a putrefare — Sieri a basso potere agglutinante.

CONIGLI: N.º 1 grigio Kg. 1.150 — N.º 2 bianco Kg. 1.250 — N.º 3 grigio testa rasata Kg. 1.080 — N.º 4 grigio, dorso rasato Kg. 1.300.

Giorno 18 agosto 1902 iniezione di 1 cc di coltura in brodo di b. tifico di 48 h. in cavità peritoneale.

Giorni 20 VIII; 22 VIII; 24 VIII; 26 VIII; stesso trattamento.

Il giorno 29 VIII (sera) pratico il salasso dalla carotide dei conigli N.º 1 e N.º 2 — La mattina seguente 30 agosto pratico il salasso ai conigli N.º 3 e N.º 4, nonchè ad un coniglio N.º 5 controllo (Bianco Kg. 0.970).

Le determinazioni del potere agglutinante dei sieri separati dal sangue dei precedenti salassi mi danno i seguenti risultati — N.º 1 grigio: 1/200 — N.º 2, bianco: 1/400 — N.º 3, testa rasata: 1/300 — N.º 4, dorso rasato: 1/340 — N.º 5 controllo, bianco: risultato negativo all'1/5.

La sera del 30 agosto separo i sieri dai rispettivi coaguli versandoli in boccette da siero, non sterilizzate ed aggiungendo in ciascuna boccetta 1 goccia d'acqua di conduttura. Chiudo le boccette con tappo di sughero, per evitare l'evaporazione e la diffusione del cattivo odore, e pongo nella stanza termostato ad una temperatura le cui variazioni, nello spazio di settimane, oscillano al massimo fra 31 e 34 gradi C.º

Per fare la determinazione del potere agglutinante nei sieri putrefatti in cui si formano abbondanti fiocchi e deposito, essendomi impossibile il ricorrere alla filtrazione, come dirò

in seguito, a proposito degli estratti di organi, mi valse del metodo seguente: raccoglievo con pipetta una certa quantità del siero putrefatto e centrifugavo in tubi con fondo conico: dalla parte sopranatante, meno torbida, prendevo con pipetta graduata una quantità determinata, che diluivo al 1/10 o talvolta all'1/5 con acqua fisiologica sterilizzata, centrifugando poi di nuovo. Con tali diluizioni, sia diluendo prima ancora all'1/100 e all'1/200 quando si trattava di sieri ad alto valore, sia aggiungendole direttamente sul brodo di cultura, potevo fare delle determinazioni assai esatte, senza che la torbidezza ed il contenuto batterico ridotto al minimo colle centrifugazioni e le diluizioni, venisse a turbare l'esame.

Ricordo qui, e ciò vale specialmente per l'esame dei sieri ad alto potere, che esporrò in seguito, che le cifre indicanti il potere agglutinante sono approssimative e che l'approssimazione è tanto minore quanto più elevato è il potere del siero, inquantochè allora si rende necessario l'uso di diluizioni molto grandi. E per giunta va tenuto conto del fatto che l'occhio anche colla maggiore abitudine non apprezza sempre colla stessa chiarezza e nello stesso modo il punto limite convenzionalmente stabilito, come d'altra parte della circostanza che uno stesso siero saggiato alla stessa diluizione, colla stessa cultura tifica, nelle stesse condizioni di operazione e di ambiente, può dare delle cifre un po' differenti, per quanto molto prossime fra di loro.

2 settembre.

Dopo 3 giorni di permanenza in termostato eseguisco la seconda determinazione del potere dei sieri. I sieri si mostrano abbastanza torbidi; in fondo alle boccette v'è un po' di deposito: il loro odore non è ripugnante: è quell'odore caratteristico che si produce appunto nel siero all'inizio della putrefazione e che ha una nuance aromatica.

Siero N.º 1 grigio: 1/200 — N.º 2 bianco: 1/400 — N. 3 testa rasata: 1/260 — N.º 4 dorso rasato 1/350.

Dopo 3 giorni dunque il potere è rimasto invariato in 3 dei sieri, mentre in quello del N.º 3 si nota una leggera diminuzione. (La differenza in più del N.º 4 è da attribuirsi come ben s'intende, alle inevitabili variazioni nell'apprezzamento del potere cui ho sopra accennato: e ciò valga per tutti i casi in cui si trovassero cifre indicanti simili apparenti aumenti). Il siero N.º 3, pei suoi caratteri organolettici, non sembra essere in preda a putrefazione più avanzata che non gli altri sieri.

5 settembre.

6 giorni di permanenza in termostato.

I sieri sono tutti assai puzzolenti, in maggior grado forse il N.º 3. Sono assai torbidi, di color biancastro sporco: in fondo alle boccette deposito abbondante biancastro, e grigiastro nel N.º 3.

Determinazione del potere agglutinante. N.º 1 grigio: 1/160 — N.º 2 bianco: 1/270 — N.º 3 testa rasata: 1/100 — N.º 4 dorso rasato: 1/210.

Si nota dunque una brusca caduta del potere, che è maggiore del siero N.º 3 ch'è anche quello in cui più profonde sono le alterazioni putrefattive.

Siero N.º 5 bianco controllo: caratteri come sopra: Prova del Widal all' 1/10 negativa.

8 settembre.

9 giorni di permanenza in termostato.

Esamino soltanto i sieri N.º 1 e N.º 3. Il secondo ha un odore più acre e viroso del N.º 1, ed ha un colorito più cupo: il deposito è abbondante in ambedue.

Determinazione del potere agglutinante. N.º 1 grigio: 1/50 — N.º 3 testa rasata: 1/30.

Si è avuta, almeno per questi due sieri, una grande diminuzione del potere, che si conserva sempre maggiore pel siero più alterato.

11 settembre.

12 giorni di permanenza in termostato.

Non esamino il siero N.º 3: il N.º 1 e il N.º 4 hanno un colorito grigiastro, odore forte, acre. Il N.º 2 è puzzolentissimo, ma non acre, ha colorito più chiaro, tendente al giallastro. Il deposito è abbondante anche in esso.

Determinazione del potere agglutinante: N.º 1 grigio: 1/20 — N.º 2 bianco: 1/200 — N.º 4 dorso rasato: 1/40.

Come si vede mentre dei tre sieri esaminati due sono ridotti ad un grado assai basso di potere agglutinante, un altro, cioè il N.º 2, conserva ancora la metà del potere originario, e ciò dopo 12 giorni di permanenza in termostato e nonostante il progredito processo putrefattivo.

14 settembre.

15 giorni di permanenza in termostato.

Il siero N.º 2 conserva sempre il suo tono giallastro, mentre gli altri sono grigiastri, ed ha odore meno viroso.

Determinazione del potere: N.º 1 grigio: alla diluzione di 1/10 tracce, cioè intorpidimento dei microrganismi, e qualche addossamento di 2 o 3 elementi — N.º 2 bianco: 1/130 — N.º 3 testa rasata e N.º 4 dorso rasato negativo.

Sui 4 sieri posti a putrefare il giorno 30 agosto, dopo 15 giorni uno soltanto conserva un potere relativamente elevato: gli altri lo hanno perso completamente o solo ne conservano tracce trascurabili.

17 settembre.

Siero N.º 2 bianco: caratteri non mutati: solo l'odore un po' più acre: potere 1/30. Si ebbe dunque una brusca diminuzione.

19 settembre.

Siero N.º 2 bianco — all' 1/10 si ha risultato negativo: cioè appena tracce di agglutinazione.

Siero N. 5 bianco controllo — è nerastro, puzzolente, con deposito scuro: non ha alcun potere agglutinante all' 1/10.

Il siero N.º 2 dunque ha perso il suo potere agglutinante solo dopo 20 giorni circa.

I risultati sopra esposti possono essere riassunti nella seguente tabella:

Siero del coniglio	Tempo intercorso fra l'ultima iniezione e il salasso	Potere agglutinante del siero sterile	Potere agglutinante dopo permanenza in termostato (33°) per giorni						
			3	6	9	12	15	18	20
N. 1 - grigio	Giorni 3 1/2	1/200	1/200	1/160	1/50	1/20	traccie	—	—
N. 2 - bianco		1/400	1/400	1/270	—	1/200	1/130	1/30	traccie
N. 3 - grigio testa rasata	Giorni 4	1/300	1/260	1/100	1/30	—	negativa	—	—
N. 4 - grigio dorso rasato		1/340	1/350	1/210	—	1/40	negativa	—	—
N. 5 - bianco controllo	—	negativa all' 1/5	—	negativa	—	—	—	—	negativa

B) Seconda serie di sieri posti a putrefare. — Sieri a potere medio.

Ai conigli 1, 2, 3, 4, sopra indicati, pratico il giorno 1.^o settembre un secondo salasso dall'altra carotide. sono quindi trascorsi 6 1/2 giorni dall'ultima iniezione.

La determinazione del potere agglutinante eseguita il giorno 2 IX mi dà i seguenti risultati:

Siero N.^o 1 grigio: 1/850 — N.^o 2 bianco: 1/1800 — N.^o 3 testa rasata 1/700 — N.^o 4 dorso rasato: 1/2400.

Infettati con una goccia d'acqua di conduttura e posti in termostato a 31.^o — 34.^o

Questi sieri non furono esaminati metodicamente come quelli della serie sopra esposta, e come quelli della serie seguente. — alcuni furono esaminati molte volte, altri poche volte. Inoltre non permasero sempre continuamente in termostato: qualcuno tratto fuori dal termostato ebbe a restare alla temperatura ambiente per 24 o 48 ore, per esser quindi rimesso in termostato. Nelle indicazioni dei periodi di putrefazione che sono qui sotto riportate per questa serie di sieri, tali intervalli trascorsi fuori del termostato non poterono esser tenuti in conto.

Siero con. N.^o 1 grigio: potere 1/850 — lo esamino una sola volta dopo 26 giorni di permanenza in termostato. Puzzolentissimo, grigiastro, deposito abbondante. La prova del Widal all' 1/10 è negativa: si ha soltanto tracce di agglutinazione.

Siero con. N.^o 2 bianco, potere: 1/1800.

Dopo 2 giorni di permanenza in termostato: è puzzolente assai, torbo, fioccoso. Potere: 1/1800 (scarso).

Dopo 7 giorni di termostato: fetore fortissimo: deposito biancastro. Potere: 1/70.

Dopo 13 giorni: potere: 1/50 — 1/60.

Dopo 24 giorni: potere: 1/25.

Dopo 26 giorni: negativo.

Siero con. N.^o 3 grigio testa rasata, potere: 1/700.

Dopo 3 giorni: poco puzzolente: torbo ma non omogeneo, giallastro: potere: 1/500.

Dopo 5 giorni: puzzolente, torbo, deposito biancastro. Potere: 1/300.

Dopo 15 giorni: odore fortemente acre, colore grigiastro, deposito abbondante. Prova del Widal negativa al 1/10.

Siero con. N.^o 4 grigio dorso rasato, potere: 1/2400.

Dopo 1 giorno. Aspetto un po' opacato, a chiazze. Odore non sgradevole a nuance aromatica. Potere: 1/2500.

Dopo 5 giorni. Torbo, biancastro, fioccoso. Odore piuttosto aromatico sgradevole. Deposito bianco. Potere: 1/1900.

Dopo 11 giorni. Torbissimo, colorito grigiastro: deposito idem. Odore acre, penetrantissimo. Potere 1/30.

Dopo 20 giorni. Come sopra, ma un po' meno torbo. Odore sgradevolissimo ma meno penetrante. Potere 1/20.

Dopo 32 giorni. Prova del Widal negativa a 1/10.

C) Terza serie di sieri posti a putrefare — Sieri ad alto potere agglutinante.

CONIGLIO N.° 10 grigio Kg. 1.400 — N.° 13 grigio Kg. 1.150 — N.° 14 grigio Kg. 1.060 — N.° 15 bianco Kg. 1.200.

Giorno 24 settembre iniezione di 1/2 cc di cultura in brodo di b. tifico di 48 h. in cavità peritoneale.

Giorno 27 IX iniezione di 2/3 cc cultura brodo 48 h. intraperitoneale.

Giorno 30 IX iniezione di 1 cc cultura brodo 48 h. in cavità peritoneale.

Il giorno 8 ottobre (sera) cioè dopo 8 1/2 giorni circa dall'ultima iniezione pratico un salasso dalla carotide ai 4 conigli.

Il 9 X eseguisco le determinazioni del potere agglutinante dei vari sieri ottenendo i seguenti risultati: N.° 10: 1/5400 — N.° 13: 1/5300 — N.° 14: 1/6000 — N.° 15: 1/5600.

Il giorno seguente 16 ottobre pongo i sieri separati dai rispettivi coaguli in boccette da siero non sterilizzate, infetto con una goccia d'acqua potabile: chiudo con turacciolo di sughero e pongo in termostato a 31° — 34° i sieri N.° 10, N.° 13, N.° 14.

Pongo nella stanza antitermostato a temperatura 21° — 24° il siero del coniglio N.° 15.

14 ottobre — 4 giorni di permanenza in termostato.

I sieri sono torbi: colorito giallognolo, più roseo nel N.° 10 ch'era lievissimamente tinto dal sangue. L'odore di putrefazione incipiente non è sgradevole, è piuttosto aromatico nei sieri N.° 10 e N.° 13: il N.° 14 è un po' più puzzolente e torbo.

Determinazione del potere agglutinante: N.° 10: 1/5400 — N.° 13: 1/5400 — N.° 14: 1/5000.

Il siero del coniglio N.° 15 bianco che da 4 giorni si trova, infettato con acqua, in antitermostato a 21° — 24° si presenta un po' intorbidato, a chiazze, lasciando qualche spazio limpido. È appena apprezzabile un po' di odore, non sgradevole.

Il suo potere agglutinante si dimostra uguale a 1/5500.

Dunque dopo 4 giorni di permanenza alla temperatura di 33 gradi circa, su tre sieri due, per quanto notevolmente mutati nei loro caratteri, non presentano diminuzione alcuna del potere agglutinante, mentre il terzo, un po' più alterato, è diminuito, ma non grandemente, di potere, cioè da 1/6000 a 1/5000.

Il siero esposto a temperatura di 23° circa non presenta diminuzione del suo potere agglutinante (per le ragioni esposte altrove, la differenza in meno di 1/100 è da trascurarsi).

17 ottobre — 7 giorni di permanenza in termostato.

I sieri sono assai torbi e mandano fetore. Il più puzzolente di tutti è il siero N.º 10 che è pure fortissimamente torbo ed ha un colorito grigio. Il deposito è abbondante ed ha un tono grigiastro. Il N.º 13 è pure molto puzzolente, mentre il N.º 14 ha un odore, per quanto sgradevolissimo, a tono più aromatico. Inoltre il N.º 14 ha formato minor quantità di deposito di colorito quasi bianco.

Determinazione del potere: N.º 10: 1/300 — N.º 13: 1/1000 — N.º 14: 1/1300.

Il siero del N.º 15, da 7 giorni in antitermostato, sa cattivo odore, ma non eccessivamente: è assai meno torbido degli altri e presenta delle zone più limpide.

Il potere agglutinante è uguale a 1/4600.

Si scorge dunque come dopo 7 giorni di permanenza a 33° due sieri, pur presentando una notevolissima diminuzione rispetto al potere originario, sieno ancora dotati di un forte potere agglutinante (1/1000 e 1/1300 rispettivamente) mentre il terzo (N.º 10) possiede solo un potere uguale circa alla 20ª parte dell'originario, dimostrando di aver subita una brusca diminuzione dall'ultimo esame.

Nel siero esposto a 23° si è verificata solo una scarsa diminuzione.

20 ottobre — 10 giorni di permanenza in termostato.

I tre sieri N.º 10, 13, 14 sono assai torbi: il colorito è giallastro nel N.º 14 e grigiastro negli altri due: il deposito, un po' meno abbondante nel N.º 14 è grigiastro in tutti ma più pallido nel N.º 10 e nerastro nel N.º 13. Infine l'odore è nauseante in tutti, ma è più acre, addirittura irresistibile nel N.º 13 ed ha una tendenza agliacea nel N.º 10.

Determinazione del potere: N.º 10: 1/130 — N.º 13: all' 1/20 tutti i microrganismi si presentano torpidi: qualche gruppetto di 6 - 10 elementi, staccati e un po' mobili: aggiungendo 10 gocce di diluzione del siero 1/10, a 5 gocce di cultura, cioè eseguendo la prova all' 1/15 si ha la reazione positiva limite. — N.º 14: 1/180.

Il siero N.º 15 ha colorito giallastro roseo: non è moltissimo torbo, ma l'intorbidamento si è adesso fatto diffuso. Il deposito è assai abbondante, bianco. L'odore abbastanza forte e sgradevole.

Il potere agglutinante risulta uguale a 1/3700.

Mentre dunque dopo 10 giorni i sieri esposti a 33° sono enormemente ridotti in potere agglutinante ed uno ne è quasi interamente sprovvisto, quello esposto a 22° conserva ancora circa 2/3 del potere originario.

24 ottobre — 14 giorni di permanenza in termostato.

I sieri conservano l'aspetto ed i caratteri precedentemente indicati: anche l'odore del N.º 14 si è fatto acre e viroso.

Determinazione del potere agglutinante: N.º 10: 1/120 — N.º 13: negativa del tutto al 1/20 — N.º 14: 1/30.

Siero N.º 15. Tono di colore un po' più grigiastro, odore un po' più sgradevole.

Il suo potere agglutinante è di 1/3400.

27 ottobre — 17 giorni di permanenza in termostato.

Poche variazioni nei caratteri dei sieri: soltanto l'odore, pur mantenendosi sgradevolissimo, è un po' meno intenso e ributtante: inoltre le parti superficiali sono un po' meno torbe delle parti profonde.

Determinazione del potere agglutinante: N.° 10 : 1/50 — N.° 14 : negativa totalmente all' 1/20.

Il N.° 15 che presenta gli stessi caratteri ha un potere agglutinante di 1/3500.

30 ottobre — 20 giorni di permanenza in termostato.

Il siero N.° 10 si mostra assai meno torbo nella parte superficiale. Il suo potere risulta uguale a 1/30 — 1/40.

Il siero N.° 15 conserva il potere agglutinante di 1/3500.

Come si scorge dunque da queste tre ultime serie di determinazioni, dei 3 sieri esposti a 33°, due hanno perduto completamente il loro potere fra il 14° e il 17° giorno: l'altro che pure aveva cominciato a depauperarsi prima dei rimanenti, conserva un certo, per quanto scarsissimo, potere dopo 20 giorni di permanenza in termostato. Per causa di forza maggiore non potei più oltre seguire le sorti di questo siero, che ben probabilmente dopo 3 o 4 giorni più si sarebbe mostrato del tutto inattivo.

Il siero N.° 15 esposto a 22° circa, dopo aver subito una lievissima diminuzione rispetto al 10° giorno, si è conservato dipoi fino al 20° dotato sempre dello stesso potere, notevolmente elevato (1/3500).

Quest'ultima serie di determinazioni su sieri ad alto potere può essere riassunta nel seguente specchietto:

Siero del coniglio	Tempo intercorso fra l'ultima iniezione ed il salasso	Potere agglutinante del siero sterile	Temperat. cui fu esposto il siero	Potere agglutinante dopo giorni					
				4	7	10	14	17	20
N. 10 - grigio	Giorni 8 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5400}$	33°	$\frac{1}{5400}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{130}$	$\frac{1}{120}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{35}$ (circa)
N. 13 - grigio	»	$\frac{1}{5300}$	»	$\frac{1}{5400}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{15}$	negativa	—	—
N. 14 - grigio	»	$\frac{1}{6000}$	»	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{1300}$	$\frac{1}{180}$	$\frac{1}{30}$	negativa	—
N. 15 - bianco	»	$\frac{1}{5600}$	22°	$\frac{1}{5500}$	$\frac{1}{4600}$	$\frac{1}{3700}$	$\frac{1}{3400}$	$\frac{1}{3500}$	$\frac{1}{3500}$

Dalle esperienze sui sieri sopra esposte si può trarre le seguenti conclusioni:

Il processo putrefattivo, alla temperatura di 33° C.° circa, fa scomparire in capo a qualche tempo, il potere agglutinante del siero di sangue per il bacillo tifico.

Il fatto si avvera ugualmente in sieri a basso e ad alto potere agglutinante e presso a poco nello stesso tempo, cioè dopo un periodo di esposizione in termostato che varia dai 14 ai 20 giorni.

La diminuzione del potere agglutinante non avviene a poco a poco regolarmente: anche dopo qualche giorno di esposizione in termostato, dopo essere stati infettati con acqua di conduttura, e nonostante che i caratteri del siero (fétore, torbidezza, deposito) dimostrino che il processo putrefattivo è abbastanza avanzato è possibile che i sieri presentino un potere uguale o quasi all'originario. Dipoi si ha bruscamente una diminuzione del potere, in genere assai rilevante, e che sembra essere più notevole, relativamente, pei sieri ad alto valore agglutinante. Tale discesa suole avvenire nei sieri nelle condizioni da me realizzate, fra il 5.^o e il 7.^o giorno di putrefazione, e suole spesso susseguire ad una variazione nel fetore del siero, che perde la sua nuance aromatica per divenire veramente nauseante. — dipoi la diminuzione avviene con po' più di lentezza. La perdita totale o quasi del potere suole concidere con un'altra variazione del fetore del siero, che si fa più acre e viroso.

Anche ponendosi nelle condizioni più costantemente simili, la diminuzione e la scomparsa del potere agglutinante non avviene collo stesso andamento e nello stesso periodo di tempo in diversi campioni di siero anche se dotati di ugual potere. Ciò sta in rapporto colla diversa rapidità ed intensità del processo putrefattivo, che può verificarsi nonostante la costanza delle condizioni di esperimento.

Infine i sieri in cui avviene più brusca e rilevante la caduta iniziale del potere agglutinante, non sono sempre quelli che più prontamente lo perdono del tutto. Valga per esempio il Siero N.^o 10 che dopo 4 giorni conserva il potere iniziale di $1/5400$, dopo 7 giorni era sceso enormemente, a $1/300$, e che pure dopo 20 giorni conservava ancora, per quanto in minimo grado ($1/35$) potere agglutinante.

Per ciò che riguarda il siero tenuto a temperatura di 22° circa, si scorge come in esso le cose si svolgano assai diversamente: esso pure verso il 7.^o giorno presenta una diminuzione che non è però molto rilevante: tale diminuzione continua fin verso il 14.^o cioè all'incirca fino al momento in cui

gli altri sieri hanno perduto quasi totalmente il loro potere e poi si arresta, lasciando al siero un potere sempre assai notevole che raggiunge quasi i $2/3$ del potere iniziale.

II. - ESPERIENZE SUGLI ORGANI IN PUTREFAZIONE.

Queste esperienze si presentavano più importanti dal punto di vista dal problema che io intendevo studiare, e anche assai più lunghe e complicate nella loro esecuzione. Infatti per potere saggiare il potere agglutinante degli organi mi era necessario il farne gli estratti. Seguì, come il più opportuno in questo caso, il metodo più semplice, già usato da vari ricercatori, quali, fra gli altri, il **Löwit** (27), il **Pfeiffer** e **Marx** (8), il **Gengou** (28) e il **Deutsch** (9). Prendevo cioè parti di organi, che tagliavo a pezzi ed asciugavo con cotone idrofilo e pesavo quindi su vetrino da orologio. Mettevo i tessuti in mortai di porcellana ed aggiungevo una piccola quantità di sabbia quarzosa. Il **Löwit** usava, per fare i suoi estratti leucocitari, di polvere di vetro, cui lo **Schattenfroh** (29) attribuì un'azione battericida.

Senza entrare in merito alle obiezioni di questo autore e alla confutazioni del **Löwit** (30), faccio osservare che mentre questo metodo fu seguito da altri sperimentatori, su accennati, nel caso mio potevo escludere che la sabbia da me usata avesse una qualche azione agglutinante sui bacilli tifici. Infatti mentre da un lato io avevo avuto cura di preparare acconciamente la sabbia stessa, lavandola prima con acido cloridrico, quindi con acqua corrente e poi distillata fino a reazione neutra, ed infine con soluzione fisiologica sterilizzata di NaCl, d'altro lato ogni causa di errore veniva dimostrata eliminata dal fatto di aver ottenuto più volte sia con organi non tifici (di controllo), sia con organi tifici putrefatti, colla sabbia suddetta, estratti interamente privi di proprietà agglutinanti.

Mescolata la sabbia ai pezzetti di organo, eseguivo una accurata triturazione fino ad avere una poltiglia perfettamente uniforme ed omogenea, il che era un po' più difficile col polmone, mentre riusciva assai facile cogli altri organi specie se putrefatti.

Aggiungevo quindi acqua fisiologica sterile in piccola quantità, continuavo la triturazione, e quindi aggiungevo il rimanente

di acqua fisiologica necessaria ad ottenere la diluizione voluta tritutando e rimescolando un'ultima volta. — I mortai venivano allora posti in camera umida, in luogo fresco e lasciati a sé 20 - 24 ore. — Dopo un tale periodo raccoglievo con pipetta una parte del liquido soprastante e su di esso praticavo la determinazione tenendo conto, naturalmente, della diluizione a cui era stata fatta la macerazione.

Quando si trattava di estratti di organi putrefatti, (e soprattutto di sieri putrefatti) avrei desiderato di praticare la filtrazione in modo da ottenere un liquido perfettamente limpido. Ma ciò mi risultò impossibile a farsi: già il **Widal e Picard** (31) avevano notato che il filtraggio su candela di porcellana diminuiva o toglieva interamente il potere agglutinante al filtrato. Per scrupolo di sperimentatore e per vedere quale fosse effettivamente, quantitativamente determinato, l'influsso del filtraggio attraverso filtro Berkefeld, la cui candela filtrante è di materiale diverso da quella di porcellana, ripetei alcune prove.

A. Siero sterile.

Siero coniglio 4 (dorso rasato) limpidissimo.

Una parte diluisco ad $1/10$ e filtro attraverso filtro Berkefeld. Il filtrato diluisco ancora ad $1/10$ e su tale diluzione a $1/100$ pratico la determinazione del potere che mi risulta uguale ad $1/800$.

Su altra parte del siero stesso non filtrato diluito ad $1/100$ eseguisco la determinazione del potere, uguale ad $1/2400$.

La filtrazione ha dunque diminuito il potere da $1/2400$ a $1/800$.

B. Siero putrefatto.

Siero coniglio 3 (testa rasata) — 5 giorni a 33° e un giorno fuori termostato. Torbo, puzzolente assai, deposito biancastro abbastanza abbondante.

Una parte diluita a $1/10$, viene filtrata attraverso filtro Berkefeld. — Il potere del siero risulta uguale ad $1/20$.

Un'altra parte viene centrifugata ed una porzione del centrifugato viene diluita a $1/10$ eppoi centrifugata a lungo nuovamente: il liquido soprannatante è abbastanza torbo. Potere del siero = $1/300$.

La filtrazione ha dunque quasi tolto il potere, abbassandolo da $1/300$ a $1/20$.

C. Estratto di organo putrefatto.

Midollo osseo del coniglio 14 grigio — Potere del siero $1/6000$.

È in stato non molto avanzato di putrefazione; tuttavia l'odore è sgradevolissimo.

L'osso denudato dalle parti molli, in capsule di vetro, è stato tenuto 24 ore in termostato eppoi 9 giorni a temperatura di 22° .

Faccio macerazione diluendo ad $1/20$. Dopo 24 ore raccolgo un poco del liquido lattiginoso sopranatante.

Una parte filtro. — Mescolando a parti uguali filtrato e cultura tifica (diluizione a $1/40$ non si ha alcun agglutinamento: mescolando 16 gocce di estratto e 4 di cultura (diluizione a $1/25$) non si ha alcun gruppo, ma i bacilli appaiono torpidi o fermi.

Su di un'altra parte non filtrata eseguisco altra determinazione: il potere è uguale a $1/240$.

La filtrazione ha dunque tolto quasi del tutto il potere agglutinante di $1/240$.

Noto che in queste prove invece del comune filtro Berkefeld, per eseguire un filtraggio attraverso il quale è necessaria una certa quantità di liquido, facevo uso di un filtro Berkefeld modificato, attraverso il quale potevasi filtrare anche 2 cc. di liquido.

Non potendo dunque, per le mie ricerche, filtrare attraverso filtri porosi, dovetti contentarmi di far uso per le determinazioni di liquidi non perfettamente limpidi.

Come operassi per i sieri, ho già indicato. Riguardo agli estratti devo notare come, avendo cura di lasciare i mortai contenenti la macerazione in luogo fresco, in capo a 20 - 24 h. veniva a surnatare un liquido generalmente assai limpido, di colorito variabile, che però esaminato al microscopio mostrava la presenza di piccolissime granulazioni. Soltanto l'estratto di midollo osseo si mostrava sempre lattiginoso e torbo. Tuttavia la determinazione anche con questo estratto, se riusciva più difficile, non era impossibile.

Sulla distribuzione e comportamento delle sostanze battericide, ed anche delle sostanze agglutinanti negli organi, esistono vari lavori, sia per ciò che si riferisce all'infezione tifica, sia per trattamento con altre specie di microrganismi. Do un breve accenno in proposito, fermandomi un po' più sopra i lavori che riguardano l'infezione tifica, e particolarmente la distribuzione della sostanza agglutinante.

Fra le prime indagini sulla ripartizione delle sostanze agglutinanti nell'organismo dei tifosi sono da annoverarsi quelle del **Courmont** (32, 33) che osservò il potere agglutinante del sangue di vari organi di cadaveri di individui morti per tifo, trovando che il sangue del cuore, dei polmoni, della tiroide ecc. ha un potere uguale a quello verificato nel sangue del vivente. E poichè dalle sue ricerche avrebbe avuto per risul-

tato che invece il sangue della milza, delle ghiandole mesenteriche dava scarsa reazione, ne concludeva che le sostanze agglutinanti venissero distrutte in tali organi dal bacillo tifico che in grande abbondanza vi si trovava presente. Ora che tale ipotesi sia erronea, lo dimostrano le varie constatazioni sopra riportate, fra cui quelle del **Widal** e del **Winterberg**.

Ricerche con metodo sperimentale accurato sono quelle di **Pfeiffer** e **Marx** (8) i quali studiarono l'origine degli anticorpi colerici, riferendola al midollo osseo, alle ghiandole linfatiche mesenteriche, ai polmoni e soprattutto alla milza, il cui potere immunizzante era dapprima maggiore che quello del sangue, per farsi poi uguale ed infine minore. Sulle agglutinine coleriche però gli autori non ci danno dati, solo dicendo che sembrano seguire lo stesso andamento per le sostanze immunizzanti. Il **Wauters** (34) trovò dotato delle maggiori proprietà battericide il midollo osseo e quindi la milza e le ghiandole linfatiche ed i polmoni.

Fodor e **Rigler** (4) affermarono che nel siero di sangue prima che in ogni organo compaiono le proprietà agglutinanti negli animali infettati con bacilli tifici, e lo stesso dissero in base alle loro esperienze l'**Achard** e **Bensaude** (35).

I risultati riguardo alle sostanze immunizzanti antitifiche ottenuti dal **Pfeiffer** e **Marx** furono confermati dal **Wassermann** (36) che le riscontrò soltanto nella milza, nel midollo e nelle ghiandole linfatiche.

Sull'origine delle sostanze agglutinanti nell'infezione col bacillo aerogeno pubblicò un buon lavoro il **Van Emden** (23), il quale riscontrò sostanze agglutinanti in quasi tutti gli organi, ma particolarmente nella milza, nel midollo osseo e nelle ghiandole linfatiche: e come il **Pfeiffer** per gli anticorpi colerici riscontrò che la milza possiede sul principio dell'immunizzazione un potere superiore a quello del siero di sangue, per poi pareggiarlo, ed infine averlo minore di esso.

Il **Gengou** (28) nello stesso anno 1899 si occupò delle agglutinine per il carbonchio, ritrovando un potere agglutinante più forte che negli altri organi nel pancreas una volta, e nella milza l'altra volta: tale potere era però sempre inferiore a quello del sangue. E pure nel 1899 il **Deutsch** (9) pubblicava numerose indagini sull'origine degli anticorpi tifici, in seguito alle quali concludeva che le sostanze immunizzanti si possono

trovare nella milza e nel midollo osseo in maggior quantità che nel siero di sangue; questi stessi organi contengono in forte quantità pure sostanze agglutinanti, ma non mai in maggior quantità che nel siero di sangue: contraddicendo così a quanto era stato affermato dal **Pfeiffer** e **Marx** pel colera e da **Van Emden** pel bacillo aerogeno e confermando invece l'affermazione del **Fodor** e **Rigler**.

Non è facile intendere i risultati ottenuti dal **Rath** (25) il quale facendo l'estratto di milze tolte da 2 - 5 giorni dopo l'iniezioni di culture tifiche, in 8 volte su 9 avrebbe trovato tale estratto privo di potere agglutinante, e lo stesso avrebbe verificato per il midollo osseo e per le ghiandole linfatiche.

In un recente lavoro l'**Iatta** (10) torna ad affermare che nella milza il potere dapprima è più elevato che nel siero di sangue.

Ad ogni modo è cosa accertata, non solo pel microrganismo tifico, ma ancora per altri microrganismi, che negli organismi trattati con culture tifiche, non solo il siero di sangue ma ancora vari organi presentano un notevole potere agglutinante ch'è particolarmente accentuato nella milza, nel midollo delle ossa, nelle ghiandole linfatiche. E se si pensa che anche nell'uomo il valore agglutinante del siero di sangue può giungere a cifre assai elevate (per esempio il **Foerster** (37) trovò dei sieri di tifici potenti fino ad $1/5000$) ben s'intende come anche negli organi del cadavere di tifosi si possano riscontrare in quantità notevole le sostanze agglutinanti. Non ho parlato a bella posta del polmone, perchè le ricerche del **Deutsch** (9) dimostrerebbero che il polmone dell'animale vergine è dotato di un notevole potere agglutinante, non specifico del resto (infatti si verificava oltre che per il bacillo di Eberth $1/200$, pel bacterium coli $1/100$, per il bacillo della peste $1/60$, il vibrione colerigeno $1/80$). Tale potere agglutinante ch'egli avrebbe trovato nel polmone di 4 cavie nuove, l'avrebbe riscontrato anche nel polmone del coniglio, del ratto, e del topo.

Poichè questo fatto presentava un certo interesse dal punto di vista delle mie ricerche, volli ripetere l'indagine del **Deutsch** e non so veramente come intendere la diversità dei risultati da me ottenuti: mentre non uno degli animali da lui esaminati avrebbe avuto polmoni privi di agglutinine, quasi tutti i polmoni da me esaminati di animali nuovi, mi dettero risultati completamente negativi.

Non ho esaminato, è vero, molti animali ma nè dal polmone di due conigli (N.° 7 e N.° 9) nè da quello di una cavia, nè da quello di un cane, nè da un polmone umano, cioè da 5 polmoni di 4 specie animali diverse, ebbi reazione agglutinante, almeno al 1/10. Soltanto un polmone di coniglio (Dal lab. di anat. di Genova) mi dette la reazione, scarsa, all' 1/20.

Il **Deutsch** inoltre negli animali trattati con iniezioni di culture tifiche avrebbe riscontrato che il polmone possiede una maggior quantità di agglutinine che non il siero di sangue: invece nelle mie prove su animali non putrefatti il polmone (e si noti che nel mio caso gli organi non venivano anemizzati) pur mostrandosi ricchissimo in sostanze agglutinanti (e ciò certamente, almeno in massima parte, in dipendenza del contenuto in sangue) non si palesò mai dotato di potere superiore od uguale o vicino al siero e nemmeno al sangue.

E con questi miei risultati, che derivano da ricerche non istituite a questo scopo particolare, e che perciò non sono numerose, concorderebbero quelli ottenuti per le agglutinine da altri autori. Così per il bacillo aerogeno, **Van Emden** (23) che esaminando il potere degli organi studiò qualche volta anche quello del polmone, non ci indica mai che il polmone avesse un potere agglutinante maggiore del siero e nemmeno del sangue: così in un caso in cui il potere del siero era di 1/15000 (e quindi il sangue era calcolato a 1/7500) il polmone carico di sangue dimostrava un potere uguale a 1/5000, che però su parti dell'organo anemizzate si riduceva ad 1/1200. -- E così il **Geugou** (28) per il carbonchio, in una cavia, in cui il potere del siero era di 1/300, trovò che il potere dell'estratto polmonare era di 1/14.

A) Comportamento delle sostanze agglutinanti negli organi in putrefazione separati dal cadavere.

Queste ricerche furono fatte sugli organi di 3 conigli, che, separati dai rispettivi cadaveri, furono posti a putrefare in condizioni differenti. Queste serie di ricerche fu da me compiuta sia per determinare effettivamente quale fosse il decorso della diminuzione del potere agglutinante in ogni singolo organo preso in considerazione, sotto l'influsso della putrefazione, sia perchè in queste indagini cogli organi separati potevo fare le determinazioni del potere dei singoli organi allo stato di freschezza, avanti che fossero aggrediti dal processo putrefat-

tivo, cosa che, naturalmente, non mi era possibile fare con cadaveri interi inumati.

È appunto in queste determinazioni praticate sugli organi freschi di conigli trattati con iniezioni di culture tifiche che ho avuto quei dati riguardo al polmone cui accennavo più sopra ed inoltre ho ottenuto altri dati riguardo alla distribuzione delle sostanze agglutinanti nei vari organi. A questo proposito devo però far notare come nelle mie esperienze le cose procedessero in modo un po' diverso che in quelle degli altri autori, poichè questi desiderando conoscere quali fossero le quantità di sostanze agglutinanti che appartenevano al parenchima di ciascun organo, avevano cura di uccidere l'animale col dissanguamento, e togliere poi agli organi così anemizzati, quanto più sangue potevano: io invece avendo uno scopo tutto diverso, per il quale era anzi necessario che gli organi non avessero un contenuto sanguigno di troppo inferiore al normale, uccidevo i conigli mediante un forte colpo di mano alla nuca e poi mi accontentavo di lavare i singoli organi, su cui dovevo sperimentare, con acqua, asciugando quindi con cotone idrofilo, e togliendo soltanto il sangue alla superficie.

Ciò premesso accenno i dati ottenuti in proposito, riassumendo in tabella, in quantochè le particolarità sopra ogni singola esperienza sono esposte in seguito:

Coniglio	Giorni trascorsi dall'ultima iniezione	Potere agglutinante del siero di sangue	Potere agglutinante del			
			Fegato	Polmone	Milza	Midollo
N. 4 dorso rasato	6 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2400}$	$\frac{1}{140}$	$\frac{1}{780}$	$\frac{1}{320}$	—
N. 14 - grigio	8 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{6000}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{1200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{370}$
N. 15 - bianco	8 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5600}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{1550}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{480}$

Come si scorge, il polmone si mostrò sempre dotato del maggior potere agglutinante: il fegato, non essendo anemizzato, per effetto del suo notevole contenuto in sangue si palesò dotato di potere più rilevante che non in esperienze di altri autori, fatte le debite proporzioni: la milza poi del coniglio 4 ucciso dopo 6 giorni e 1/2 circa dall'ultima iniezione si mostrò relativamente al potere del siero, più potente che non quella dei conigli 14 e 15 uccisi dopo 8 1/2 giorni dall'ultima iniezione.

E veniamo all'esperienze cogli organi putrefatti.

Coniglio 4 dorso rasato. — Trattamento indicato (pag. 9).

Il giorno 1.^o settembre sottraggo con salasso, del sangue, il cui siero esaminato il 2 IX mi dimostra un potere di 1/2400.

Nel pomeriggio del 1.^o settembre uccido l'animale: e dal cadavere tolgo i seguenti organi: fegato, milza, polmoni. Asciugo con cotone idrofilo ed un pezzo di ciascuno degli organi sopra indicati peso accuratamente su vetrino da orologio, e depongo quindi in mortaio di porcellana. Aggiungo sabbia silicea lavata, trituro finamente, diluisco poi, sempre tritutando, con soluzione di NaCl al 0.8 per 100 sterilizzata, fino al 1/10. Lascio poi i mortai, chiusi in grossa capsula di vetro in ambiente umido, al fresco. — Dal coniglio stesso tolgo anche il femore e la tibia d'ambe le parti, denudo le ossa dalle parti molli e trituro poi mediante un tritratore in metallo, finamente, ottenendo una poltiglia a grossi granuli. Una porzione di questa poltiglia, macero in mortaio come è sopra indicato.

Pongo quindi in 4 capsule di Petri rispettivamente alcuni pezzi di polmone, alcuni pezzi di fegato, tutta la milza rimanente tagliata in 3 parti, ed infine il rimanente della poltiglia di osso e midollo, tutti dopo averli lavati con acqua di conduttura.

Faccio qui notare come questo mezzo di tritare l'osso insieme al midollo che mi era sembrato dapprima più adatto, mi apparve di poi assai poco rispondente allo scopo, sia perchè non mi permetteva di fare delle determinazioni di potere assoluto del midollo osseo, ma solo delle determinazioni relative, sia perchè si scostava troppo dalle condizioni normali in cui il midollo osseo va incontro alla putrefazione. Nelle esperienze quindi cogli altri conigli, e coi conigli interrati, le ossa venivano rotte colla forbice, scheggiandole pel lungo, e il midollo veniva tolto assai bene, sia sotto forma ancora compatta, sia come liquame quando la putrefazione era avanzata.

Nelle capsule di Petri pongo anche dei batuffoli di cotone intrisi d'acqua: le metto quindi in termostato a 33°. Le tolgo dopo 24 h. e le dispongo in giardino, protette, alla temperatura esterna.

Il giorno seguente dagli estratti fatti cogli organi freschi, tolgo con pipetta una parte del liquido limpido sopranatante ed eseguisco le determinazioni del potere agglutinante che mi danno i seguenti risultati:

Fegato: 1/140 — Polmone: 1/780 — Milza: 1/320 — Midollo osseo (poltiglia d'osso e di midollo); 1/90.

Giorno 7 IX — giorni 6 di putrefazione.

Nella capsula, un po' piccola, in cui si trovano i pezzi di fegato si è formato un liquido abbastanza abbondante, in cui i pezzi di fegato sono immersi per $2/3$. L'odore è quello caratteristico del fegato all'inizio della putrefazione. Le parti sommerse sono di un rosso vinoso, mentre le altre hanno un colorito ardesiaco. — I pezzi di polmone, assai fetenti, nella parte adesa al fondo della capsula si mantengono di un colorito rosso cupo. Lo stesso dicasi per i pezzetti di milza. — La poltiglia d'osso e midollo puzza assai e presenta delle muffe.

Da ciascuna capsula prendo una porzione di organo, di cui preparo l'estratto colle solite modalità, facendo la diluizione a $1/10$ per tutti, fuorchè per la milza che vien diluita al $1/20$.

Determinazione del potere agglutinante (giorno seguente):

Fegato: $1/100$ — Polmone: $1/740$ — Milza: $1/300$ — Midollo (poltiglia): $1/40$.

Giorno 11 settembre — 10 giorni di putrefazione.

Il fegato non è molto variato: l'odore è un po' più putrefattivo: verso via il liquido che come prima ha lasciato le parti immerse colorite in rosso vinoso.

I pezzetti di milza sono un po' essiccati ed aderenti al fondo della capsula. — I pezzi di polmone pure grigio verdastri alla superficie, sono assai meno alterati nella parte che aderisce al vetro. La poltiglia di midollo ed osso si è fatta dura ed è ricoperta da belle muffe colorate.

Preparo gli estratti col solito metodo e solite diluizioni:

Determinazione del potere agglutinante degli estratti: giorno seguente.

Fegato: $1/100$ (scarso) — Polmone: $1/600$ — Milza: $1/220$ — Midollo (poltiglia): $1/20$ (scarso).

Giorno 16 settembre — 15 giorni di putrefazione.

Il fegato si presenta, ora ch'è libero di liquido, tutto di colore ardesiaco nelle parti superficiali, ma le parti aderenti hanno ancora traccia di color vinoso, l'odore putrefattivo non è molto accentuato. Il polmone invece continua a puzzare assai, ma esso pure nelle parti aderenti al vetro si mostra poco alterato (e dilacerando poi in mortaio si vede come le parti centrali del pezzo sieno ancora colorate in rosso cupo): l'ultimo pezzo di milza si è nuovamente essicato. La poltiglia ossea non si presenta modificata.

Preparo gli estratti col solito metodo ed consuete diluzioni. Il giorno seguente determino il potere agglutinante:

Fegato: $1/40$ — Polmone: $1/460$ — Milza: $1/200$ — Midollo (poltiglia) negativa ad $1/20$.

Giorno 22 settembre — 21 giorno di putrefazione.

Le alterazioni putrefattive sono un po' più accentuate, sia nel fegato che nel polmone, avendo avuto cura di mantenere sempre umida la capsula.

Preparo gli estratti del fegato e del polmone (la milza è esaurita) ed il giorno seguente ne determino il potere: Fegato: $1/30$ — Polmone: $1/200$.

Giorno 25 settembre — 24 giorni di putrefazione.

Nel fare la macerazione del polmone si nota come nelle parti interne del

pezzo vi sia sempre colorazione rossastra. Fatti gli estratti del fegato e del polmone il loro potere agglutinante esaminato il giorno 26 risulta: Fegato ad $1/20$ tracce — Polmone $1/120$.

Essendomi dovuto assentare alla fine del mese alcuni giorni da Siena, non potei curare l'unico pezzo di polmone rimasto: cosicchè si essiccò alquanto: il giorno 5 X ne esaminai il potere che riscontrai uguale ad $1/80$.

Coniglio 14 grigio. — Trattamento indicato (pag. 14).

Il giorno 8 ottobre pratico un salasso dalla carotide: il siero di sangue, esaminato il giorno seguente, mi si palesa dotato di un potere agglutinante uguale a $1/6000$.

Subito dopo il salasso uccido l'animale con un colpo alla nuca: eseguisco quindi la necropsia raccogliendo i polmoni, il fegato, la milza, due femori e due tibie.

Il giorno seguente procedo alla preparazione dei pezzi da esporre alla putrefazione: questa volta, veduti gli inconvenienti del metodo seguito cogli organi del coniglio 4, preferii porre gli organi in antitermostato, dove la temperatura era costante fra 21° e 23° , ed inoltre di chiuderli ermeticamente in modo che non si verificasse l'essiccamento. Dopo aver fatto un prelevamento di un pezzo di ciascuno dei tre organi sopra indicati, ed inoltre del midollo di una tibia, pongo separatamente, tagliati a pezzi, dopo aver lavato con acqua di conduttura, ed asciugato con cotone idrofilo, il fegato, il polmone, la milza e le 3 ossa rimanenti in opportune vaschette, nelle quali aggiungo dei batuffoli di cotone intrisi d'acqua. Chiudo con coperchi di capsule Petri, imparaffinando, e pongo in termostato a 33° circa dove lascio per 24 ore, passando di poi le vaschette in antitermostato a 22° dove le lascio definitivamente.

Dalle porzioni di organi freschi preparo coi metodi indicati gli estratti diluendo la milza ad $1/10$ e gli altri organi ad $1/5$: lascio 24 h. in luogo fresco.

Il giorno seguente (10 X) pratico la determinazione del potere agglutinante di questi estratti che mi risulta il seguente: Fegato: $1/400$ — Polmone: $1/1200$ — Milza: $1/400$ — Midollo osseo: $1/370$.

Giorno 16 ottobre — dopo 7 giorni di putrefazione.

I pezzi di polmone molto puzzolenti: questi pezzi come quelli di fegato e di milza sono stati rivoltati 3 giorni prima: tuttavia la superficie aderente al vetro è nel polmone meno alterata ed è ancor colorata in rosso e non in grigio verdastro, come le altre parti. Il fegato ha il suo odore caratteristico: è alterato però quasi ugualmente in tutta la superficie. Ha prodotto un po' di liquido che getto via: altro ne avevo gettato via 3 giorni avanti. Il midollo osseo non è molto alterato nel colorito, ch'è tuttora rosso giallastro, e non è ridotto a poltiglia.

Aperto le vaschette si sente un forte fetore: ma il midollo estratto dall'osso non è molto puzzolente. I pezzi di milza, non molto puzzolenti, sono alterati ugualmente su tutta la superficie.

Prelevo parti di ciascun organo: faccio la macerazione e la diluizione di ciascuno ad $1/10$, meno che la milza che per il poco peso del pezzo (50 mgr.) diluisco ad $1/20$.

Il giorno seguente (17 X) eseguisco le determinazioni. Il potere agglutinante è il seguente: Fegato: $1/50$ — Polmone: $1/800$ — Milza: $1/200$ (scarso) — Midollo: $1/350$.

Giorno 22 ottobre — dopo 13 giorni di putrefazione.

I pezzi di fegato hanno il solito odore: il colorito e l'aspetto è come se fossero stati lessati: non sono per nulla disfatti, o ridotti a poltiglia. I pezzi di polmone sono alla superficie ridotti a poltiglia grigio-verdastra, ma all'interno, come si scorge triturandoli, sono sempre rossastri. I pezzi di milza sono assai rammolliti. Il midollo osseo è ridotto ad un liquame fetentissimo.

Faccio un prelevamento da ciascuna vaschetta e faccio le macerazioni e le diluizioni col solito metodo e colle stesse diluizioni che nell'esperimento precedente.

Pongo i mortai al fresco in camera umida.

Il giorno seguente (23 X) eseguisco le determinazioni del potere agglutinante:

Fegato: $1/30$ — $1/40$ - Polmone: $1/750$ - Milza: $1/180$ - Midollo: $1/20$.

Giorno 20 ottobre — dopo 20 giorni di putrefazione.

Il fegato non è molto variato: solo un po' più disfacibile. Il polmone continua nell'interno dei pezzi ad essere rossastro: è sempre puzzolente. — L'ultimo pezzo di milza pesa solo 40 mgr. ed è molto rammollito. Il midollo osseo come sopra: il fetore però meno accentuato.

Eseguisco le macerazioni e le diluizioni: la milza è diluita ad $1/20$. Il giorno seguente (30 X), le determinazioni del potere agglutinante mi danno i seguenti risultati: Fegato: $1/25$ — Polmone: $1/300$ — Milza: negativa ad $1/30$ (10 gocce estratto e 5 di cultura) — Midollo osseo: negativa.

Dopo 20 giorni di putrefazione a 22° dunque il potere agglutinante è scomparso nella milza e nel midollo osseo, ed è quasi scomparso nel fegato: soltanto nel polmone il potere per quanto grandemente diminuito, permane abbastanza rilevante.

Non potei sorvegliare l'andamento ulteriore del potere agglutinante in questi pezzi di polmone, inquantochè per dovere di ufficio doveti abbandonare l'Istituto di cui ero ospite.

Coniglio 15 bianco. — Trattamento indicato (pag. 14).

In questa esperienza i pezzi di organi preparati come pel coniglio 14 furono posti in termostato a 33° il giorno 9 ottobre. Il siero ottenuto dal salasso praticato il giorno 8 ottobre aveva un potere agglutinante di $1/5600$. Uccisi il coniglio la sera stessa in cui praticai il salasso e ne feci l'autopsia il giorno seguente. Da ciascun organo, avanti di porlo in vaschette chiuse a paraffina, con batuffoli di cotone intrisi d'acqua di conduttura, presi un pezzetto del quale feci la macerazione e la diluizione colla solita tecnica.

Il giorno 10 ottobre determinai il potere degli estratti sopradetti: Fegato: $1/320$ — Polmone: $1/1550$ — Milza: $1/400$ — Midollo: $1/480$.

11 ottobre — dopo 2 giorni a 33° .

I pezzi dei vari organi non sono molto alterati: il polmone sa odore sgradevole ed è coperto da una leggera patina grigiastra. Il midollo osseo è compatto.

Preparo gli estratti diluendo ad $1/10$, meno la milza che diluisco ad $1/20$.
Posti come al solito in luogo fresco in camera umida per 24 h. Il 12 ottobre eseguisco le determinazioni del potere agglutinante: Fegato: $1/300$ — Polmone: $1/1350$ — Milza: $1/280$ — Midollo: $1/500$.

Dunque all'infuori della milza, quasi nessuna diminuzione del potere.

13 ottobre — dopo 4 giorni di putrefazione a 33° .

I pezzi sanno tutti cattivo odore: particolarmente il polmone e le ossa. Il fegato ha fatto ancora del liquido rossastro, che verso via. Il midollo osseo è assai rammollito e puzzolente.

Fatti gli estratti col solito procedimento, il giorno seguente determino il potere agglutinante: Fegato: $1/80$ — Polmone: $1/900$ — Milza: $1/130$ — Midollo osseo: $1/40$.

16 ottobre — dopo 7 giorni di putrefazione a 33° .

Il fetore dei pezzi è grandissimo, meno che pel fegato. I pezzi di fegato sono un po' rammolliti e di colore ardesiaco. Quelli di polmone alla superficie ridotti a poltiglia grigia verdastra, ma nell'interno ancora coloriti in rosso cupo. Il midollo osseo è ridotto a liquame un po' denso in alcuni punti, fetentissimo.

Il 17 X determino il potere agglutinante degli estratti preparati il giorno innanzi cogli organi suddetti: Fegato: $1/30$ — Polmone: $1/520$ — Milza: $1/60$ — Midollo osseo: ad $1/20$ tracce di agglutinazione (vari bacilli torpidi e qualche gruppetto instabile di 3 o 4).

19 ottobre — dopo 10 giorni di putrefazione a 33° .

Le condizioni degli organi sono simili a quelle su indicate: solo il processo putrefattivo appare più avanzato. Nelle parti interne del pezzo di polmone, eseguendo la macerazione, si scorge sempre colorito rossastro.

Il 20 eseguisco le determinazioni del potere degli organi di cui ho preparato il giorno innanzi gli estratti col solito metodo: Fegato: reazione negativa ad $1/20$ — Polmone: $1/300$ — Milza: tracce ad $1/30$ (10 gocce d'estratto e 5 di cultura) — Midollo osseo: prova negativa ad $1/20$.

Il potere agglutinante è dunque scomparso dal fegato e dal midollo osseo e quasi dalla milza: permane tuttora, assai diminuito, nel polmone, che continuo a tenere in esame. I pezzi di milza sono esauriti.

23 ottobre — dopo 14 giorni a 33° .

I pezzi di polmone si trovano nelle condizioni precedentemente descritte; in qualche punto dell'interno del pezzo che macero il colorito è tuttora tendente al rosso cupo. Preparo l'estratto di un pezzo, diluendo ad $1/10$: Potere agglutinante esaminato il 24 X uguale ad $1/100$.

27 ottobre — dopo 18 giorni a 33° .

Come sopra: tuttavia macerando il pezzo di polmone si presenta tutto di colorito grigiastro o grigio verdastrastro. Il potere dell'estratto, determinato il giorno seguente è di $1/25$ (scarso).

29 ottobre — dopo 20 giorni a 33° .

Preparo l'estratto dell'ultimo pezzo di polmone rimasto, ch'è in condi-

zioni simili a quelle precedentemente indicate. Il fetore però è meno penetrante. Potere agglutinante determinato il 30 X ; La prova riesce negativa ad 1/20.

Riassumendo in tabelle i risultati ottenuti con questa serie di esperienze :

Organi lasciati putrefare alla temperatura esterna (Settembre)

Coniglio N.º 4 — Potere del siero: 1/2400

Organi	Potere agglutinante dell'organo fresco	Potere agglutinante dopo giorni				
		6	10	15	21	24
Fegato	1/140	1/100	1/100 (scarso)	1/40	1/30	traccie ad 1/20
Polmone	1/780	1/740	1/600	1/460	1/200	1/120
Milza	1/320	1/300	1/220	1/200	manca materiale	—
(Midollo triturato coll'osso)	(1/90)	(1/40)	(1/20)	negativa	—	—

Organi lasciati putrefare in termostato a 22.º

Coniglio N.º 14 — Potere del siero 1/6000

Organi	Potere agglutinante dell'organo fresco	Potere agglutinante dopo giorni		
		7	13	20
Fegato	1/400	1/50	1/30 - 1/40	1/25
Polmone	1/1200	1/800	1/750	1/300
Milza	1/400	1/200 (scarso)	1/180	negativa ad 1/30
Midollo osseo	1/370	1/350	1/20	negativa

Organi lasciati putrefare in termostato a 33°

Coniglio N. 15 — Potere del siero 1/5600

Organi	Potere agglutinante dell'organo fresco	Potere agglutinante dopo giorni						
		2	4	7	10	14	18	20
Fegato	1/320	1/300	1/80	1/30	negativa	—	—	—
Polmone	1/1550	1/1350	1/900	1/520	1/300	1/100	1/25 (scarso)	negativa
Milza	1/400	1/280	1/130	1/60	traccie ad 1/30	—	—	—
Midollo osseo	1/480	1/500	1/40	traccie ad 1/20	negativa	—	—	—

Si scorge dunque, tenendo conto particolarmente delle esperienze praticate cogli organi degli ultimi due conigli (N. 14 e 15), che :

Il potere agglutinante viene dapprima attenuato e poi annullato negli organi in seguito alla putrefazione.

La rapidità della diminuzione e scomparsa del potere agglutinante è in rapporto colla intensità e rapidità del processo putrefattivo, e non avviene con ugual decorso in tutti gli or-

gani, verificandosi con grande rapidità nel midollo osseo in cui scompare appena che esso ha perduta la sua compattezza riducendosi a liquame, e con maggior lentezza che in ogni altro organo nel polmone in cui è in genere possibile trovare traccia di potere agglutinante finchè alcuna parte dell'organo mostra ancora un po' di colorito rossastro.

B) Esperienze con animali inumati.

In queste esperienze, che son quelle che più esattamente riproducono il decorso pratico dei fatti, interrai dei conigli, trattati con iniezioni di culture tifiche; ed esumandoli dopo vari periodi di tempo determinai il potere agglutinante degli organi fegato, milza, polmone, midollo osseo. I primi conigli inumati che sono i numeri 1, 2, 3, 5 furono lasciati 48 ore dopo l'uccisione rinchiusi nella gabbia, esposti all'ambiente esterno: gli altri 2, numeri 10 e 13, furono lasciati soltanto 24 h. in tale condizione. Dipoi gli animali, che avevano all'orecchio fissato il rispettivo numero, in metallo, venivano chiusi in cassette di legno, di fattura grossolana, deponendoli su di un pannolino. Le cassette venivano sotterrate alla profondità di 50 - 70 centimetri, nel terreno adiacente alla stalla dell'istituto, terreno tufaceo, abbastanza compatto. Al momento dell'esumazione, rilevati i caratteri esterni procedevo all'autopsia, su di un tavolo all'aria aperta. Gli organi o le parti d'organi deponevo in vetri da orologio, racchiudendo in grosse capsule di Petri. Nel laboratorio poi prelevavo le quantità necessarie per fare gli estratti che eseguivo colla solita metodica già indicata. I cadaveri utilizzati venivano rimessi nella cassetta e seppelliti nuovamente.

Allorchè feci la prima inumazione seppellii tre conigli trattati con tifo più un controllo, coll'intendimento di praticare le esumazioni dopo trascorsi intervalli di tempo diverso. Ma guidato da un preconetto, attesi ben 20 giorni ad eseguire la prima esumazione. Vedendo quel giorno che la putrefazione era talmente avanzata che di alcuni organi quasi non si aveva più tracce, esumai anche gli altri conigli. E preparati degli altri animali, praticai nuove inumazioni, e le consecutive esumazioni dopo intervallo minore di tempo.

Ed ecco senz'altro le esperienze, esposte non nell'ordine

in cui furono eseguite, ma sibbene in ordine progressivo di durata del periodo di inumazione.

I. - CONIGLIO N.º 10 — peso Kg. 1.400.

Tre iniezioni di cultura tifica in brodo, di 48 h. nelle dosi rispettivamente di cc. $1/2$, $2/3$, 1 coll' intervallo di 72 ore. Ultima iniezione 30 IX 1902. Salasso il giorno 8 X. — Uccisione subito dopo con colpo alla nuca. — Potere agglutinante del siero (9 X) uguale ad $1/5400$.

Viene seppellito, nelle condizioni suindicate, in cassetta di legno, il giorno seguente, dopo che è stato esposto all'aria aperta rinchiuso nella sua gabbia (insieme al N.º 13) per 24 h.

Il giorno 18 ottobre, nel pomeriggio, cioè dopo 9 giorni di inumazione e 10 dalla morte, si eseguisce l'esumazione. Tolgo il cadavere dalla cassetta sollevando i lembi del pannolino su cui è deposto, e ne eseguisco la necropsia.

L'animale appare in stato di avanzata putrefazione. Il fetore che ne esala è fortissimo, sì da richiedere l'otturazione delle narici con batuffoli di cotone. La parte dell'animale ch'era poggiata sul fondo, riposa su di un liquame fetentissimo che ha intriso buona parte del panno. La pelle della testa forma delle pieghe: gli occhi sono profondamente infossati. Il pelo che è sulla testa, e nei punti declivi, umido e lucente, si distacca ovunque facilmente ad una lieve trazione. L'addome è fortissimamente ingrossato sì che l'animale ha un aspetto gigantesco. Apro l'addome, con molta cautela per non ledere gli intestini che appaiono enormemente distesi da gas; le anse intestinali però sono ben distinte l'una dall'altra. Il fegato è appiattito assai; nella sua maggior parte ha assunto un colorito roseo grigiastro, ma in alcuni punti è addirittura grigio ed in altri verdognolo. La milza è ridotta ad una sottile linguetta che non fu facile ritrovare. All'apertura della cavità toracica tutto il contenuto appare colorato in rosso carminio. I polmoni abbastanza ben conservati nella loro forma, sono in alcune parti del colore suaccennato e in altre grigi. Apro il cuore e ne traggio un po' di liquame ed una piccola massa rappresa di color rosso carminio. Tolgo una tibia e ne estraggo il midollo osseo che non è ridotto a liquame e si stacca benissimo dal canale, mantenendo la sua forma.

Del fegato e del polmone prendo soltanto una parte, lasciando il rimanente in sito: ripongo quindi il cadavere nella cassa, che chiudo e faccio nuovamente seppellire.

Degli organi presi faccio gli estratti: durante la quale operazione apprezzo come il liquame tolto dal cuore ed il polmone, come pure il midollo osseo, sieno fetentissimi. Macerato con sabbia, diluito con acqua fisiologica, lascio riposare per 20 h. circa in camera umida, al fresco. La parte soprannatante degli estratti è allora limpida per il fegato e la milza, meno per il polmone ed ancor meno per il liquame estratto dal cuore ed il midollo osseo.

Eseguisco le determinazioni del potere agglutinante: Fegato: $1/50$ — Milza: $1/50$ — Midollo osseo: $1/290$ — Polmone: $1/400$ — Liquame tolto dal cuore: $1/130$.

II. - CONIGLIO 10 sopradetto — viene nuovamente esaminato il giorno 25 ot-

tobre cioè dopo 16 giorni d'inumazione e 17 dalla morte. Il fetore è ripugnante: la putrefazione appare ancora più progredita: i peli si distaccano con maggiore facilità. Il fegato ha preso un colorito grigio verdastro più uniforme. Il polmone ha un colorito verdognolo, ardesiaco in alcune parti. La consistenza sia dell'uno che dell'altro organo è assai diminuita. Estruendo il midollo osseo dal canale midollare di un femore, esso si presenta non più compatto, ma è assai rammollito, di consistenza non omogenea.

Dagli organi suddetti preparo gli estratti; nel tagliare il polmone vedo come una parte di esso, quella più prossima all'ilo, conservi ancora colorito rossastro. Preparo dunque col polmone due estratti; l'uno colle parti più colorite in verdastro e in grigio, l'altro colle parti che presentano ancora un po' di colorito rosso.

Il giorno seguente pratico la determinazione del potere agglutinante: Fegato: $1/35$ — Midollo: $1/160$ — Polmone: parti verdastre: $1/50$; parti conservanti ancora qualche po' di color rosso: $1/300$ (scarso).

III. - CONIGLIO N.º 13 — Peso Kgr. 1.150. Trattato come il N.º 10. Ultima iniezione il giorno 30 IX 1902. Salasso l'8 X. Uccisione subito dopo con un colpo di mano alla nuca.

Il potere agglutinante del siero, determinato il giorno 9 X, mi risulta uguale ad $1/5300$.

Il giorno 9, dopo essere stato esposto all'aria aperta, nella gabbia, per 24 ore circa, il cadavere viene riposto, su di un pannolino, entro una cassetta di legno, che si seppellisce accanto alla cassa del N.º 10.

Il giorno 25 ottobre cioè dopo 17 giorni dalla morte e 16 di inumazione disseppellisco il cadavere (insieme coi resti, già esumanti altra volta, del N.º 10).

Questo coniglio sembra esser sottostato ad un processo putrefattivo meno rapido che non il coniglio 10, inquantochè i caratteri riscontrati nel cadavere di esso, dopo 16 giorni di inumazione, corrispondono presso a poco a quelli che avevo constatato nel coniglio 10 sette giorni avanti. Anche questo è fetentissimo, riposa su di un liquame grigio verdastro, il pelo si distacca con lieve trazione, l'addome è fortissimamente disteso. Il fegato ha un colorito grigio ardesiaco, si lascia spappolare facilmente. La milza è meno alterata di quello che non fosse nel coniglio 10. Aprendo la cavità toracica non si nota colorazione rosso carminio, ma invece grigio verdastra e rosso bruna secondo i punti: i polmoni al taglio appaiono poco resistenti, spappolabili, in alcune parti coloriti ancor distintamente in rosso bruno. in altre verde-grigio; sono fetentissimi.

Il midollo osseo pure è fetentissimo, si spappola nel toglierlo dalla cavità: ha colorito rossigno.

Pesate parti di ciascuno di questi organi, le macero con sabbia, diluisco colle proporzioni volute di acqua fisiologica, macero nuovamente e lascio poi circa 22 h. al fresco in camera umida.

Il giorno seguente (26 X) pratico le determinazioni del potere che mi danno i seguenti risultati: Fegato: $1/30$ — Milza: $1/70$ — Polmone: $1/700$ — Midollo osseo: $1/325$.

IV. - CONIGLIO N.º 1 — Peso Kgr. 1.150. 5 iniezioni di 1 cc. ciascuna di cultura in brodo di bacillo tifico, vivente, di 48 h. in peritoneo, ogni 48 h. — Ultima iniezione 26 agosto. Salasso 1.º settembre. Uccido dopo il salasso con un colpo alla nuca.

Il potere agglutinante del siero determinato il giorno 2 IX, è uguale ad 1/850.

Coniglio N.º 2 bianco — Kgr. 1.250 — Trattato come il precedente — Salasso ed uccisione il 1.º settembre. Potere agglutinante del siero (2 IX): 1/1800.

Coniglio N.º 3 — Kgr. 1.080 — Trattato come i precedenti. Salasso ed uccisione il 1.º settembre. Potere agglutinante del siero: 1/700.

Coniglio N.º 5 — Kgr. 0.970 bianco — Non subì trattamento alcuno. Siero di sangue, ottenuto da salasso del 30 agosto, privo di potere agglutinante ad 1/5. Viene ucciso il giorno 1.º settembre.

Il giorno 3 settembre, dopochè i conigli rimasero esposti per circa 48 h. all'aria aperta nelle rispettive gabbie (1), si procede all'incassamento, rinchiudendo i conigli N.º 1 e 2 grigio e bianco (numeri attaccati all'orecchio) nella cassa A uno accanto all'altro e in modo che i corpi sieno divisi dai rispettivi pannolini, il coniglio 3 (testa rasata) nella cassa B, ed il coniglio 5 (bianco controllo) nella cassa C. Le cassette vengono poi seppellite alla profondità di 60 - 70 centimetri, nel terreno prossimo all'edificio della stalla.

Il giorno 23 settembre pratico l'esumazione dapprima del coniglio 3 (testa rasata) eppoi, veduto l'avanzatissimo grado di putrefazione, anche degli altri conigli tutti.

I cadaveri, e particolarmente quelli dei N.º 1, 2, 3 sono in preda ad avanzatissima decomposizione: Il fetore che ne esala è grandissimo. Sui pannolini sottostanti ai cadaveri si trova un liquame abbondante fetidissimo, frammisto a peli: i peli si distaccano alla minima trazione, anche al semplice contatto. Divaricando gli arti per mettere il cadavere in posizione dorsale, gli arti stessi quasi si distaccano. La cavità addominale non è più rivestita anteriormente dalle pareti addominali ed il contenuto è ridotto ad una massa friabile, grigia, dall'aspetto terroso, nella quale è ormai impossibile riconoscere le anse intestinali e i vari organi. In nessuno degli animali meno che nel controllo bianco, dove era ridotta ad un sottile lacerto semi spappolato, mi fu possibile rintracciare la milza. Nel coniglio bianco (N.º 2 cassa A) mi fu anzi impossibile rintracciare parti ancor conservate e riconoscibili del fegato, mentre negli altri l'organo era ben riconoscibile. Nella cavità toracica i polmoni, molto puzzolenti apparivano assai alterati: dal cuore del coniglio N.º 2 potei raschiare un po' di liquame ancor rossastro. Le ossa si lasciano disgiungere alle articolazioni colla maggior facilità, e così pure si denudano

(1) Devo notare a questo proposito e per maggiore esattezza nell'esposizione dei dati, che le gabbie da conigli nello Istituto d'Igiene sperimentale dell'Università di Siena, vengono riposte all'aria aperta, ma entro palchetti da ogni parte protetti da finissima rete metallica, che impedisce la penetrazione delle mosche. (Sistema *Simonetta*).

benissimo dalle parti molli : all'apertura del canale midollare si può raccogliere un liquame non omogeneo, nel coniglio 1.^o di tinta giallastra, negli altri biancastro.

Nel preparare gli estratti il fegato appare facilmente spappolabile, di color grigio chiaro nel coniglio 1.^o e grigio giallastro nel 3.^o e 5.^o Il polmone non ha colorito uniforme : grigio da alcune parti, verdastro in altre, ardesiaco in alcuni punti : è anch'esso facilmente spappolabile e la sua diversità dalla consistenza del polmone fresco è rilevantissima.

Le alterazioni del coniglio 5 (bianco controllo) sono minori che quelle quelle degli altri conigli, e ciò probabilmente in dipendenza del suo stato di salute al momento dell'uccisione.

Preparai gli estratti all' 1/5 dei seguenti organi (meno la milza che fu diluita ad 1/10) :

Polmone dei conigli 1.^o ; 2.^o ; 3.^o ; 5.^o

Fegato dei conigli 1.^o ; 3.^o ; 5.^o

Milza del coniglio 5.^o

Midollo osseo dei conigli 1.^o ; 2.^o ; 3.^o ; 5.^o

Liquame cuore del coniglio 2.^o

Gli estratti preparati col solito metodo, ma senza la macerazione con sabbia, pel midollo osseo e per il liquame cuore (N.^o 2), furono lasciati in camera umida al fresco per 24 h. circa.

Il giorno 24 settembre faccio la prova del potere agglutinante dei vari estratti coi seguenti risultati :

Coniglio 1.^o grigio : Fegato all' 1/10 : prova del Widal negativa — Midollo osseo : negativa.

Coniglio 2.^o bianco : Polmone : negativa — Midollo osseo : negativa — Liquame cuore : negativa.

Coniglio 3.^o testa rasata : Fegato : 1/10 positiva scarsa (gruppi piccoli, ad elementi alquanto distinti, numerosi liberi e mobili) ; ad 1/20 : negativa — Polmone : 1/10 positiva ; 1/20 positiva scarsa (anche qui numerosi liberi e mobili) — Midollo osseo : negativa.

Coniglio 5.^o bianco controllo : Polmone : Fegato : Milza : Midollo : negativi ad 1/10.

I risultati ottenuti colle esperienze sugli animali inumati possono essere riassunti nella seguente tabella :

Animali inumati	Potere agglutinante del siero	Giorno del seppellimento	Durata dell' inumazione	Potere agglutinante degli organi			
				Fegato	Milza	Polmone	Midollo osseo
N.º 10	1/5400	9 ottobre 1902	9 giorni (10 dalla morte)	1/50	1/50	1/400	1/290
N.º 13	1/5300	9 ottobre 1902	16 giorni (17 dalla morte)	1/30	1/70	1/700	1/325
N.º 10 (risotterrato dopo l'autopsia il 18 ottobre)	1/5400	9 ottobre 1902	16 giorni (17 dalla morte)	1/35	—	Parti verdastre 1/50 Parti rossastre 1/300	1/160
N.º 1	1/850	3 settembre 1902	20 giorni (22 dalla morte)	nullo	—	nullo	nullo
N.º 2	1/1800	3 settembre 1902	20 giorni (22 dalla morte)	—	—	nullo	nullo
N.º 3	1/700	3 settembre 1902	20 giorni (22 dalla morte)	1/10	—	1/20	nullo
N.º 5 controllo	nullo	3 settembre 1902	20 giorni (22 dalla morte)	nullo	nullo	nullo	nullo

In queste esperienze coi cadaveri inumati mentre mi avvicinavo assai più alle condizioni che sogliono verificarsi in pratica, mancavo di un dato abbastanza importante, cioè del potere agglutinante degli organi di ciascun animale al momento della morte. Poichè come abbiamo veduto, mentre il potere degli organi sta, in generale, in rapporto col potere del siero di sangue, questo rapporto non è poi così stretto; ed anche per animali trattati nell'identico modo ed uccisi alla medesima distanza di tempo dall'ultima iniezione di cultura tifica, può variare di assai (vedasi la tabella pag. 27): non solo; ma anche il rapporto del potere degli organi fra di loro, anche a parità di condizioni, può subire delle variazioni ed il midollo osseo, per es., essere più o meno ricco di sostanze agglutinanti che non il fegato e la milza, e via dicendo. Pur tuttavia il dato da noi posseduto, cioè il potere agglutinante del siero di sangue al momento dell'uccisione, è più che sufficiente per farci ritenere quale fosse, con approssimazione molto lata, il potere agglutinante degli organi nei singoli conigli. E risalta di conseguenza subito agli occhi come dopo 9 e 16 giorni di inumazione (10 e 17 rispettivamente dalla morte) tal potere fosse certamente diminuito di assai nei conigli da me esaminati in quelle date condizioni, e come dopo 20 giorni (22 dalla morte) su tre conigli uno solo conservasse scarse tracce di potere agglutinante nel polmone e nel fegato.

Prendendo adesso ad esaminare complessivamente i risultati ottenuti studiando le modificazioni del potere agglutinante negli organi in putrefazione, fossero essi isolati dall'organismo, oppure lasciati in sito sul cadavere, possiamo formulare varie considerazioni.

Il processo putrefattivo fa diminuire, e può annullare in seguito, il potere agglutinante degli organi. La rapidità di tale scomparsa sta anzi tutto in rapporto colla intensità del processo putrefattivo e vano sarebbe il volere dare delle indicazioni sul tempo occorrente: le condizioni in cui io mi son posto, sia per gli organi isolati che per i cadaveri inumati corrispondono ad una o poche delle tante che possono verificarsi e per le quali il processo putrefattivo può decorrere o con piccola o con grande rapidità, esercitare completamente la sua azione oppure arre-

starsi in seguito ad essiccamento e via dicendo, condizioni sulla cui azione non è qui il luogo di intrattenersi e sulle quali il **Tamassia** (38) ci ha forniti sì abbondanti e preziosi dati sperimentali. Quello che risulta evidente dalle mie ricerche si è che solo quando le alterazioni putrefattive sieno molto avanzate può avvenire la totale scomparsa del potere agglutinante negli organi che lo possiedono.

Non è facile lo stabilire con certezza se un maggior potere agglutinante permetta di riscontrare più a lungo il potere stesso in un organo in putrefazione, ma ciò sembra che non avvenga: come già vedemmo nei sieri, anche negli organi il potere agglutinante, ad un dato momento nel corso della putrefazione, cade, in breve tempo, a cifre assai basse, senza che poi abbiano a rilevarsi gran differenze fra sieri od organi ad alto potere e sieri ed organi a basso potere agglutinante. Per tal ragione ritengo che il potere agglutinante ancora abbastanza elevato riscontrato negli organi dei conigli inumati N. 10 e 13 (che contrasta un po' coi risultati dati dagli organi dei conigli N. 1, 2 e 3 che pure rimasero inumati pochi giorni di più) non dipenda dall'alto potere agglutinante del loro siero di sangue, ma piuttosto stia in rapporto colla minore intensità del processo putrefattivo che fu rivelata dalla diversità di reperti, più rilevante assai di quel che non comportasse la piccola differenza di durata dell'inumazione. Tale minore intensità nella putrefazione fu in rapporto sia colla diversa temperatura, sia colle diverse condizioni di salute degli animali al momento della morte (ed infatti il coniglio 5 bianco, controllo, si mostrò meno putrefatto che i suoi compagni di serie). — Ed in questa opinione mi rafforza il fatto che fra i tre conigli N. 1, 2, 3 l'unico che conservasse ancor traccia di potere agglutinante era appunto il N. 3 il potere agglutinante del cui siero era minore di quello del N. 1, e meno che la metà di quello del N. 2.

E per ciò che riguarda il lato medico-legale della quistione ci appare come per un tempo non troppo breve l'esame degli organi del cadavere ci possa permettere di riscontrare in esso l'esistenza di sostanze agglutinanti. E tenuto conto della possibilità che il decorso della putrefazione sia assai meno rapido di quello che si verificò nei conigli da me inumati, e soprattutto che invece di avere un disgregamento o disfacimento degli organi si abbia in dipendenza di particolari condizioni

di terreno e di temperatura essiccazione e mummificazione, possiamo ritenere che in singoli casi si possa avere un risultato positivo anche dopo un periodo di tempo d'inumazione assai più lungo di quello da me verificato. Del resto il perito che dovesse procedere ad una simile indagine, non troverebbe grandi difficoltà a stabilire se, nel caso in esame, dall'indagine stessa fossero da attendersi risultati probatorii oppure no, quando, più che al tempo trascorso dall'inumazione, ponesse mente alle condizioni del cadavere ed al grado di putrefazione cui esso fosse pervenuto. È certo ad ogni modo che ad un risultato negativo, anche in discrete condizioni di conservazione del cadavere non sarebbe da attribuirsi grande valore probatorio, che invece non potrebbe in alcun modo negarsi ad un risultato positivo netto ed evidente. Ma anche i risultati negativi non sarebbero certo privi d'importanza, come elemento di sostegno per convincimenti desunti anche da altri dati, poichè va ricordato che la reazione di agglutinazione per il bacillo tifico ha più valore di quanto da alcuno non si creda, ed è più costante di quello che qualche caso male interpretato non abbia fatto pensare, come giustamente rileva in questi giorni il **De Rossi** (39).

*
* *

E riassumendo, le mie ricerche m'hanno permesso di fare le seguenti constatazioni:

Negli animali trattati con culture tifiche viventi il potere agglutinante del siero di sangue aumenta per un certo numero di giorni, man mano che ci si allontana dal momento dell'ultima iniezione.

In nessun organo le sostanze agglutinanti si trovano in maggiore quantità che nel sangue.

Fra gli organi presi in esame (non anemizzati) il polmone è quello che in ogni caso presenta il maggior potere agglutinante: viene quindi la milza e susseguono il midollo osseo ed il fegato.

Il polmone negli animali non sottoposti a trattamento con iniezioni di cultura tifica si mostrò quasi sempre privo di potere agglutinante (coniglio, cavia, cane, uomo): negli animali iniettati

con culture tifiche mostrò un potere, per quanto assai elevato, sempre d'assai inferiore a quello del sangue (calcolato uguale alla metà di quello del siero).

La filtrazione attraverso filtro Berkefeld trattiene gran parte delle sostanze agglutinanti.

e di dimostrare i seguenti fatti in ordine al quesito propostomi;

Il processo putrefattivo produce una diminuzione del potere agglutinante.

Tale diminuzione può giungere al completo annullamento quando il processo putrefattivo, in condizioni favorevoli d'ambiente e di temperatura, abbia una sufficiente intensità e durata.

La rapidità della diminuzione del potere agglutinante sta in rapporto colla intensità del processo putrefattivo, e quindi colle cause che sull'intensità stessa esercitano azione favorevole o sfavorevole.

La rapidità con cui il potere agglutinante diminuisce e scompare non è in stretto rapporto colla elevatessa maggiore o minore del potere agglutinante originario.

L'organo che per il primo perde il potere agglutinante è (particolarmente quando si tratti di organi sottoposti isolatamente alla putrefazione) il midollo osseo: quello nel quale più a lungo permane il potere stesso è il polmone.

Il potere agglutinante scompare più rapidamente negli organi lasciati in sito nel cadavere in putrefazione, che non negli organi esposti isolatamente alla putrefazione: ciò vale particolarmente per gli organi addominali, certo in dipendenza della diversa intensità e modalità della putrefazione nei due casi, e dello stato del contenuto addominale negli animali trattati con iniezioni di culture tifiche.

Dal cadavere esumato è possibile ottenere una reazione agglutinante positiva anche dopo qualche tempo dall'inumazione ed ad uno stadio abbastanza avanzato di putrefazione: per prevedere la probabilità maggiore o minore di un risultato positivo o per considerare l'attendibilità maggiore o minore di un risultato negativo il perito dovrà tener conto più che del periodo trascorso dalla morte, del grado e delle modalità del processo putrefattivo.

In tali casi un risultato positivo chiaro e netto, ha valore probatorio, mentre un risultato negativo, anche se la putrefazione sia poco avanzata, può fornire soltanto elementi di probabilità.

.....

Al termine del mio lavoro sento il bisogno di esprimere vive grazie al Dott. Prof. Achille Sclavo Professore d'Igiene nella R. Università di Siena, per la gentile ospitalità accordatami per l'accompagnamento di queste ricerche nel ricco laboratorio da lui diretto.

.....

LETTERATURA

- (1) **Widal et Sicard** — « Sérodiagnostic par le sang desséché au point de vue de la médecine légale et de l'hygiène publique » — Compt. rendus de la Société de biologie N. 1 - 1897 pag. 20.
- (2) **Sanarelli G.** — « Études sur la fièvre typhoïde expérimentale » — Annales de l'Institut Pasteur - VI - pag. 721, 1892.
- (3) **Remlinger P.** — « Contribution expérimentale à l'étude de la transmission héréditaire de l'immunité contre le b. d'Éberth et du pouvoir agglutinant » — Ann. de l'Inst. Pasteur - XIII - pag. 129, 1899.
- (4) **Fodor u. Rigler** — « Das Blut mit Typhusbacillen infizierten Thiere » — Centralbl. für Bakteriologie, Paras. u. Infektionskrankheiten - XXIII Bd. 1898.
- (5) **Rath D.** — « Ueber den Einfluss der blutbildenden Organe auf die Entstehung der Agglutinine » — Centralbl. f. Bakter. etc. - XXV Bd. 1899, pag. 549.
- (6) **Bail O.** — « Versuche über Typhusagglutinine und Praecipitine » — Archiv für Hygiene - XLII - pag. 307, 1902.
- (7) **Grünbaum A. S.** — « Remarks on method in serum diagnosis » — British med. Journal N. 1930 - pag. 1852, 1897.
- (8) **Pfeiffer R. u. Marx** — « Die Bildungsstätte der Cholerasschutzstoffe » — Zeitschrift f. Hygiene - XXVII Bd. pag. 272, 1898.
- (9) **Deutsch L.** — « Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques » — Ann. de l'Inst. Pasteur - XIII - pag. 689, 1899.
- (10) **Jatta M.** — « Experimentelle Untersuchungen über die Agglutination des Typhusbacillus und der Mikroorganismen der Coligruppe » — Zeitschr. f. Hygiene - XXXIII Bd. pag. 185, 1900.
- (11) **Winterberg H.** — Untersuchungen über das Typhusagglutinin und die agglutinirenden Substanz der Typhusbacillen » — Zeitschr. f. Hygiene - XXXII Bd. pag. 375, 1899.
- (12) **Johnston W.** — « Sero-diagnosis in typhoid fever » — Journal of Amer. med. Association vol. 29 pag. 95, 1897.
- (13) **Johnston W. and Mac Taggart D.** — « On the difference between serum and blood solutions, the condition of the test culture etc. » — Montreal med. Journal vol. 25 pag. 709, 1897 (recensione in Baumgarten's Jahresb. f. 1897).

-
- (14) **Guerard A. R.** — « The serum-diagnosis of typhoid fever » — Journ. of Amer. med. Association vol. 29 pag. 10, 1897.
- (15) **Pfuhl E.** — « Eine Vereinfachung des Verfahrens zur Serodiagnostik des Typhus » — Centralbl. f. Bakteriologie - XXI Bd. pag. 52, 1897.
- (16) **Vivaldi M.** — « La reazione del Widal col sangue essiccato » — La Riforma medica - XIV N. 60 pag. 712, 1898.
- (17) **Achard Ch. et Bensaude R.** — « Sérodiagnostic du cholera » — Semaine médicale 1897, pag. 151.
- (18) **Widal M. F.** — « Sérodiagnostic de la fièvre typhoïde » — Soc. méd. des Hopitaux 26 juin 1896.
- (19) **Widal et Sicard** — « Étude sur le sérodiagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques » — Annales de l'Inst. Pasteur - XI pag. 353, 1897.
- (20) **Jemma R.** — « Ueber die Serumdiagnose des Abdominaltyphus » — Centralbl. f. innere Medicin N. 3, 1897.
- (21) **Fraenkel E.** — « Baumgarten's Jahresbericht für 1897 - pag. 377.
- (22) **Babucke E.** — « Ein Apparat zur Blutentnahme bei Typhuskranken zwecks Anstellung der Widal'schen Reaktion » — Centralbl. f. Bakteriologie XXIII Bd. pag. 1092, 1898.
- (23) **Van Emden I. E. G.** — « Ueber die Bildungsstätte der agglutinirenden Substanzen bei der Infektion mit Bacillus aërogenes » — Zeitschr. f. Hygiene XXX Bd. 1899.
- (24) **Puppel** — « Ueber das Agglutinationsvermögen aufbewarthen Blutserums von Typhuskranken » — Centralbl. f. Bakteriologie - XXVIII Bd. 1900.
- (25) **Fraenkel E.** — Baumgarten's Jahresbericht für 1900 - pag. 225.
- (26) **Courmont P.** — « Disparition in vitro du pouvoir agglutinant des humeurs des typhiques lorsque on y cultive le bacille d'Eberth » — Comptes rendus de la Société de Biologie (20 mars 1897).
- (27) **Löwit M.** — « Ueber die Beziehung der Leucocyten zur bactericiden Wirkung und zur alkalischen Reaktion des Blutes und der Lymphe » — Ziegler's Beiträge zur Allgem. Pathologie Bd. XXII pag. 172, 1897.
- (28) **Gengou O.** — « Étude sur les rapports entre les agglutinines et les lysines dans le charbon » — Annales de l'inst. Pasteur - XIII - pag. 643, 1899.
- (29) **Schattenfroh A.** — « Ueber die bakterienfeindlichen Eigenschaften der Leukocyten » — Arch. für Hygiene - XXXI Bd. pag. 79, 1897.
- (30) **Löwit M.** — « Ueber baktericide Leukocitenstoffe » — Centralbl. f. Bakteriologie - XXIII Bd. - 1898.
- (31) **Dieulafoy, Widal et Sicard** — « Recherches sur la nature de la substance agglutinante et sa fixation sur les albuminoïdes du sang etc. » — Bull. de l'Acad. de Médecine, 1896.

-
- (32) **Courmont P.** — « Répartition de la substance agglutinante dans l'organisme des typhiques » — *Compt. rendus de la Soc. de Biologie* - pag. 194, 1897.
- (33) **idem** , — « Deuxieme note sur la répartition la formation et la destruction de la substance agglutinante chez les typhiques » — *Compt. rendus de la Soc. de Biol.* pag. 299, 1897.
- (34) **Wauters** — « Sur la répartition des substances bactericides dans les organes et sur la filiation des différentes especes de leucocytes » — *Arch. de Méd. expér.* N. 6 - 1898.
- (35) **Achard et Bensaude** — *Arch. de Méd. expér.* N. 6 - 1896 (citato da V. Emden).
- (36) **Wassermann A.** — « Weitere Mittheilungen über "Seitenkettenimmunität," » — *Berliner klin. Wochenschrift* N. 18 - 1898.
- (37) **Foerster O.** — « Quantitative Untersuchungen über die agglutinirende und baktericide Wirkung des Blutserums von Thiphuskranken und - Recovalescenten » — *Zeitschrift f. Hygiene* - XXIV Bd. pag. 500, 1897.
- (38) **Tamassia A.** — « Morfologia dei tessuti in putrefazione » — *Varie memorie in Rivista sperimentale di Freniatria e Med. legale.*
- (39) **De Rossi G.** — « Di uno speciale reperto batteriologico nella milza di presunti tifosi » — *Il Policlinico - sez. prat.* - Anno IX - Fasc. 4 - Nov. 1902.
-



